KURS TIERPHYSIOLOGIE

SOMMERSEMESTER 2006

FACHBEREICH BIOLOGIE
PHILIPPS-UNIVERSITÄT
MARBURG/LAHN

TERMINPLAN: TIERPHYSIOLOGISCHER KURS **SS 2006** **M O N T A G, 14.15 – 18.30 Uhr**

	Mo 24.04.	Mo 08.05.	Mo 15.05.	Mo 22.05.	Mo 29.05.	**Di** 06.06.	Mo 12.06.	Mo 19.06.	Mo 26.06.	Mo 03.07.	Mo 10.07.	**Di** 18.07.
	Folgende Versuche werden an den jeweiligen Kurstagen durchgeführt											
Gruppe 01	A	B	C	D	E	Klausur	F	G	H	I	K	Klausur
Gruppe 02	B	C	D	E	A	Klausur	G	H	I	K	F	Klausur
Gruppe 03	C	D	E	A	B	Klausur	H	I	K	F	G	Klausur
Gruppe 04	D	E	A	B	C	Klausur	I	K	F	G	H	Klausur
Gruppe 05	E	A	B	C	D	Klausur	K	F	G	H	I	Klausur
Gruppe 06	F	G	H	I	K	Klausur	A	B	C	D	E	Klausur
Gruppe 07	G	H	I	K	F	Klausur	B	C	D	E	A	Klausur
Gruppe 08	H	I	K	F	G	Klausur	C	D	E	A	B	Klausur
Gruppe 09	I	K	F	G	H	Klausur	D	E	A	B	C	Klausur
Gruppe 10	K	F	G	H	I	Klausur	E	A	B	C	D	Klausur

TERMINPLAN: TIERPHYSIOLOGISCHER KURS **SS 2006** **D I E N S T A G, 14.15 – 18.00 Uhr**

	Di 25.04.	Di 09.05.	Di 16.05.	Di 23.05.	Di 30.05.	**Di** 06.06.	Di 13.06.	Di 20.06.	Di 27.06.	Di 04.07.	Di 11.07.	**Di** 18.07.
	Folgende Versuche werden an den jeweiligen Kurstagen durchgeführt											
Gruppe 01	A	B	C	D	E	Klausur	F	G	H	I	K	Klausur
Gruppe 02	B	C	D	E	A	Klausur	G	H	I	K	F	Klausur
Gruppe 03	C	D	E	A	B	Klausur	H	I	K	F	G	Klausur
Gruppe 04	D	E	A	B	C	Klausur	I	K	F	G	H	Klausur
Gruppe 05	E	A	B	C	D	Klausur	K	F	G	H	I	Klausur
Gruppe 06	F	G	H	I	K	Klausur	A	B	C	D	E	Klausur
Gruppe 07	G	H	I	K	F	Klausur	B	C	D	E	A	Klausur
Gruppe 08	H	I	K	F	G	Klausur	C	D	E	A	B	Klausur
Gruppe 09	I	K	F	G	H	Klausur	D	E	A	B	C	Klausur
Gruppe 10	K	F	G	H	I	Klausur	E	A	B	C	D	Klausur

Programm

I: Klingenspor / Meyer / Helwig

A: Atmung und Energieumsatz
B: Blut
C: Herzphysiologie
D: Hormonphysiologie
E: Exkretion

II: Homberg / Schachtner / Stengl

F: Nervenphysiologie
G: Muskelphysiologie
H: Sinnesphysiologie
- Hören
- Sehen

I: Lernmechanismen
K: Chronobiologie

Zeitplan

Der Kurs besteht aus 10 Versuchsterminen à 5 Stunden und 2 Klausurterminen in der Mitte und am Ende des Kurses.

Montagskurs:	24.04.06 – 10.07.06, 14.15 – 18.30 Uhr
Dienstagskurs:	25.04.06 – 11.07.06, 14.15 – 18.30 Uhr
1. Klausur:	Di, 06.06.06, 13.00 – 14.00 Uhr, Gr. Hörsaal und ZGK 1015
2. Klausur:	Di, 18.07.06, 13.00 – 14.00 Uhr, Gr. Hörsaal und ZGK 1015
Nachschreibtermin:	Fr, 28.07.06, 13.00 – 14.30 Uhr, Raum siehe Aushang

Informationen für die Kursteilnehmer

Während des Semesters werden wichtige Informationen an der Tür des Kursraumes (1046) ausgehängt, so z. B. die endgültige Gruppenverteilung, der genaue Terminplan und die Klausurergebnisse. Weitere Informationen auf der Homepage „Tierphysiologie“.

Vorbereitungen

Für eine sinnvolle Arbeit im Kurs wird die Kenntnis des in der Vorlesung "Grundlagen der Tierphysiologie" behandelten Stoffes vorausgesetzt. Für die erfolgreiche Durchführung der Versuche ist es notwendig, daß sich die Kursteilnehmer anhand der Kursanleitung auf jeden Versuch vorbereiten. Die Kursanleitung finden Sie im Web unter der Adresse:

http://online-media.uni-marburg.de/biologie/tierphysiologie/

Die in den Anleitungen zu den einzelnen Versuchen empfohlene Literatur kann in der Bibliothek des FB Biologie eingesehen werden (Handapparat für Kurs Tierphysiologie). Da in einzelnen Kursteilen an und mit Tieren experimentiert wird, ist aus ethischen Gründen eine besonders gewissenhafte Vorbereitung notwendig. Diese Kursanleitung gilt sowohl für den Kurs Tierphysiologie im Bachelor-Studiengang als auch für das Staatsexamen-Hauptstudium.

Kursablauf

Die Versuche werden in Gruppen von max. sechs Studierenden durchgeführt. Jede Gruppe wechselt wöchentlich nach einem vorgegebenen Plan den Arbeitsplatz. Vor jedem Versuch findet ein Kolloquium statt, in dem geprüft wird, ob die Kursteilnehmer die für die Vorbereitung angegebenen theoretischen Grundlagen beherrschen. Nach jeweils 5 Kurstagen findet eine Klausur statt.

Voraussetzung für die Bescheinigung eines erfolgreich abgeschlossenen Kurses sind ausreichende Vorbereitung, regelmäßige Teilnahme (maximal ein entschuldigter Fehltag), sachgerechte Durchführung der Aufgaben, Abgabe und Testierung der Versuchsprotokolle, Bestehen der schriftlichen Prüfung (siehe Klausuren).

Jeder Teilnehmer erhält einen Laufzettel, auf dem die Anwesenheit und das Protokoll von den Betreuern der einzelnen Kurstage bescheinigt werden. Leistungsnachweise werden am Semesterende nur gegen Vorlage des vollständig ausgefüllten Laufzettels ausgehändigt.

Die erfolgreiche Teilnahme am Kurs Tierphysiologie ist Voraussetzung für die Aufnahme in das Vertiefungsmodul und das Praxismodul Tierphysiologie.

Handwerkszeug

Für den Kurs wird folgendes Material benötigt:
Schreibzeug, Lineal, Taschenrechner, Millimeter- und Logarithmenpapier, Protokollheft, Präparierbesteck mit zwei feinen Pinzetten, einer feinen spitzen Schere und einer größeren Schere. Bitte einen USB-Stick zur Datenspeicherung mitbringen (falls vorhanden).

Hinweise zur Anfertigung von Protokollen

Die Anfertigung eines Protokolls ist Teil des Versuchs. Experimente, die nicht dokumentiert werden, sind sinnlos. Das Protokoll sollte so geschrieben sein, daß Studierende der Biologie die Fragestellung, Methoden, Ergebnisse und Schlußfolgerungen auch dann nachvollziehen können, wenn sie den Versuch selbst noch nicht durchgeführt haben. Bei Unklarheiten in der Anfertigung eines Protokolls wenden Sie sich an die Kursbetreuer.

Akzeptiert werden nur gut lesbare, d. h. mit Schreibmaschine, Drucker, oder in lesbarer Handschrift verfaßte Protokolle. Im Rechnerraum des Fachbereiches stehen allen Studierenden Personal-Computer mit Textverarbeitungsprogrammen und Druckern zur Verfügung.

Frist: Das Protokoll eines Kurstages muß am nächsten Kurstag abgegeben werden. Das letzte Protokoll muß **testiert** am **31.07.2006** vorliegen. Das Praktikum muß im nächsten Sommersemester wiederholt werden, wenn die testierten Protokolle nicht rechtzeitig abgegeben werden.

Ansprechpartner für die Bestätigung von Protokollen **in der Schlussphase des Kurses:**

Atmung – Luzie Braulke, braulkel@staff.uni-marburg.de, Tel. 28-23496
Blut – Florian Bolze, Bolzef@students.uni-marburg.de, Tel. 28-23395
Herz – Tobias Fromme, fromme@staff.uni-marburg.de, Tel. 28-25372
Hormone – Carola Meyer, meyerc@staff.uni-marburg.de, Tel. 28-23496
Exkretion – Jörn Weßels, wessels@staff.uni-marburg.de, Tel. 28-23547
Nerven – Christian Wegener, wegener@staff.uni-marburg.de, Tel. 28-23411
Muskel – Prof. Homberg, homberg@staff.uni-marburg.de, Tel. 28-23402
Sinne – Ulrike Träger, u.traeger@web.de, Tel. 28-23475
Lernen – Joachim Schachtner, schachtj@staff.uni-marburg.de, Tel. 28-23414
Chronobio. – Monika Stengl, stengl@staff.uni-marburg.de, Tel. 28-25956

Ein Protokoll soll aus folgenden vier Kapiteln (mit diesen Kapitelüberschriften) bestehen:

1. Einleitung

Die Einleitung sollte alle Informationen enthalten, die notwendig sind, um die Fragestellung und den gewählten Versuchsansatz zu verstehen. Welche Fragen sollen mit diesem Versuch beantwortet, bzw. welche Hypothesen getestet werden? Eine ausführliche Schilderung des gesamten theoretischen Hintergrundes wie in einem Lehrbuchkapitel sollte vermieden werden.

2. Methoden

Erklärung des Versuchsaufbaus. Was wurde gemessen? Wie und wie oft wurde es gemessen? Wie wurden die Ergebnisse ausgewertet? Welche statistischen Verfahren wurden verwendet? Was muß der Leser wissen, um den nachfolgenden Ergebnisteil zu verstehen? Abkürzungen sind bei ihrer ersten Verwendung zu erklären.

3. Ergebnisse

Welche Ergebnisse wurden erzielt? Eine kurze Darstellung des Versuchsausgangs muß im Text erfolgen. Ergebnisse können auch in Abbildungen oder Tabellen dargestellt werden. Alle Abbildungen müssen eindeutige Achsenbeschriftungen und Erklärungen der verwendeten Symbole enthalten. Abkürzungen in Abbildungen und Tabellen müssen erklärt werden. Zu jeder Abbildung gehört eine Legende (was ist dargestellt?) und zu jeder Tabelle eine Überschrift (was ist in der Tabelle angegeben). Wo von Unterschieden zwischen Meßergebnissen (z. B. Mittelwerten) oder Korrelationen von Variablen gesprochen wird, sind Irrtumswahrscheinlichkeiten anzugeben (sofern statistische Verfahren verwendet wurden).

Wichtig: Der Teil "Ergebnisse" soll keine Interpretationen oder Schlußfolgerungen enthalten.

4. Diskussion der Ergebnisse

Welche Schlußfolgerungen lassen sich aufgrund der gewonnenen Ergebnisse ziehen? Konnten die in der Einleitung genannten Fragen beantwortet, bzw. die Hypothesen bestätigt oder abgelehnt werden? Dies ist der wichtigste Teil des Protokolls. Versuche und Ergebnisse ohne Interpretation sind wertlos. Im Mittelpunkt soll die Diskussion der eigenen Ergebnisse stehen, nicht etwa eine Diskussion der Lehrbuchinhalte zu diesem Thema.

Die Diskussion kann, falls erforderlich, eine Kritik der Methoden enthalten. Wichtiger ist jedoch eine Diskussion der gewonnenen Resultate, und ihrer biologischen Bedeutung.

Klausuren

Als Leistungsnachweis für den Kurs wird eine schriftliche Prüfung angefertigt. Sie besteht aus zwei Prüfungsteilen, die nach jeweils fünf Kurstagen stattfinden. Die Punkte der beiden Prüfungsteile werden addiert. Bestanden hat, wer mehr als die Hälfte der erreichbaren Punktzahl (>= 25,25) erzielt. Bei der Nachklausur müssen beide Prüfungsteile wiederholt werden. Wird ein Prüfungsteil ohne Entschuldigung (z. B. ärztliches Attest) versäumt, dann gilt der Prüfungsteil als nicht bestanden.

Unfallverhütungsvorschriften

Die Vorschriften für die Verhütung von Unfällen sind unbedingt zu beachten. Nicht mit dem Mund pipettieren, Pipettierhilfe verwenden, usw. Beim Arbeiten mit menschlichem Blut sind Schutzhandschuhe zu tragen.

Verhalten am Arbeitsplatz

Die sachgerechte Behandlung lebender Tiere vor, während und nach den Versuchen **hat Vorrang vor allen anderen Tätigkeiten.** Erst wenn die Versuchsanordnung aufgebaut und der Ablauf des Versuchs klar ist, werden die Tiere in den Versuch genommen. Geräte und Materialien werden den Kursteilnehmern z. Z. noch kostenfrei zur Verfügung gestellt und müssen deshalb sorgsam behandelt werden. Die Arbeitsplätze sollten sauber und aufgeräumt verlassen werden. Glasgeräte gründlich reinigen und mit Aqua dest. ausspülen.

KURS A: ATMUNG UND ENERGIEUMSATZ

An diesem Kurstag sollen Atmung und Energieumsatz zwischen ektothermem Fisch und endothermem Mensch verglichen werden.
Tiere beziehen die zum Leben notwendige Energie aus der Oxidation von Nährstoffen (Kohlenhydrate, Fette, Proteine). Unter Verbrauch von Sauerstoff entstehen dabei CO_2 und H_20. Der Energiegewinn pro Liter verbrauchtem Sauerstoff beträgt etwa 20 kJ. Aus dem O_2-Verbrauch (und der CO_2-Produktion) kann deshalb der Energiebedarf und -umsatz eines Tieres direkt abgelesen werden.

TEIL 1:
BESTIMMUNG DES SAUERSTOFFVERBRAUCHS BEIM FISCH

1 Einleitung

Im ersten Versuchsteil wird untersucht, wie Tiere auf Änderungen des Sauerstoffangebots im Atemmedium reagieren. Grundsätzlich lassen sich die Reaktionen auf eine Änderung der O_2-Konzentration in zwei Kategorien einteilen:

Einige Arten (z.B. Hummer) reagieren auf Änderungen der Sauerstoffkonzentration mit Änderungen ihres Sauerstoffverbrauchs und zeigen damit eine **abhängige Atmung**.

Viele Tiere (u.a. fast alle Vertebraten) sind dagegen in der Lage, bei einem verminderten Sauerstoffangebot ihren Sauerstoffverbrauch bis zu einem kritischen O_2-Partialdruck konstant zu halten und zeigen damit eine **unabhängige Atmung**. Diese Regulationsleistung wird im Kurs bei einem Fisch gemessen.

2 Vorbereitung des Kurses

2.1 Stichworte zur Vorbereitung

- Atmungsorgane bei verschiedenen Tiergruppen
- abhängige und unabhängige Atmung
- Regulation der Atmung
- O_2-Transport
- O_2-Bindungskurve
- energieliefernde Stoffwechselprozesse
- physikalische Begriffe für Arbeit, Energie und Leistung (Einheiten!)
- kalorisches Äquivalent
- Wirkungsgrad (Gesamt-, Teilwirkungsgrad)
- Partialdrücke und Wasserlöslichkeit von Gasen
- Funktionsprinzip der CLARK-Elektrode (s. Anhang)

2.2 Literatur zur Vorbereitung

zu Atmung und Energiehaushalt (alternativ):

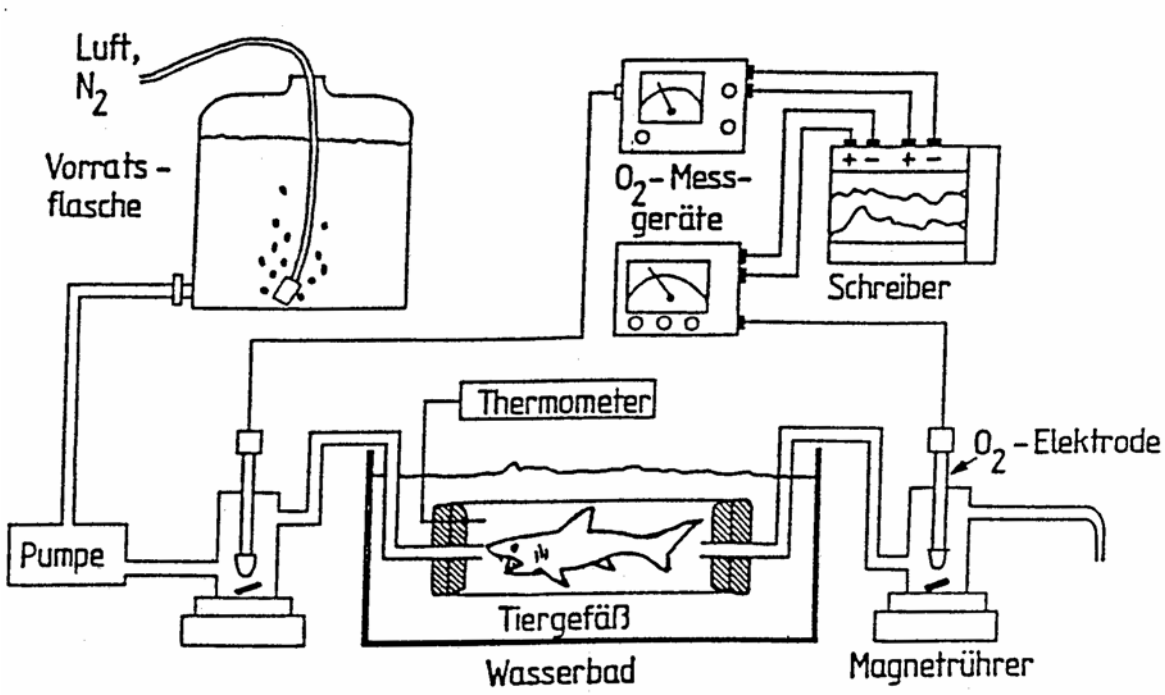
- Eckert R: Tierphysiologie. Thieme Verlag
- Heldmaier G, Neuweiler G: Vergleichende Tierphysiologie, Bd. 2 Vegetative Physiologie Springer Verlag
- Schmidt RF, Thews G: Physiologie des Menschen. Springer Verlag
- Schmidt-Nielsen K: Animal Physiologie, Cambridge University Press
- Withers, PC: Comparative Animal Physiology, Saunders
- Wehner, Gehring: Zoologie, Thieme Verlag

3 Versuchsdurchführung

Ein Tiergefäß wird aus einer Vorratsflasche mit Wasser durchströmt. Der Sauerstoffgehalt des Wassers wird vor dem Eintritt in das Tiergefäß und nach dem Austritt aus dem Tiergefäß mit je einer Sauerstoffelektrode (CLARK-Elektrode, Funktionsprinzip siehe Anhang) bestimmt. Aus der Differenz im Sauerstoffgehalt wird der Sauerstoffverbrauch (und der Energieumsatz) des Fisches berechnet.

3.1 Versuchsaufbau

Die Apparatur wird nach folgendem Schema aufgebaut:



Wenn alle Schläuche angeschlossen sind, wird der Hahn der Vorratsflasche geöffnet und das System mit Wasser gefüllt. Dann wird das gewogene Versuchstier eingesetzt (Kopf des Fisches zur Einströmöffung!), das Tiergefäß luftblasenfrei verschlossen und das System weiter gefüllt. Es dürfen sich keine Luftblasen im Leitungssystem befinden, da sie die Meßergebnisse stark beeinträchtigen würden! Mit Hilfe des Drehzahlreglers an der Peristaltikpumpe wird eine Wasserflußrate von ca. 3 l h^{-1} eingestellt. Diese Durchflußgeschwindigkeit muß während des gesamten Versuchs unbedingt konstant gehalten werden.

3.2 Eichung

1. Nullpunkt:
   Die Sauerstoffelektrode wird in Oxi-Null-Lösung (5% Natriumsulfit-Lösung) getaucht und nach ca. 5 Minuten der Nullpunkt am Meßgerät eingestellt.
2. O_2-Sättigungswert:
   Nach dem Einsetzen in die Meßküvette erhält die Elektrode O_2-gesättigtes Wasser aus der mit Preßluft durchströmten Vorratsflasche. Die Wassertemperatur wird am Digitalthermometer abgelesen, der zugehörige Sättigungswert einer Tabelle entnommen und mit einem Korrekturfaktor (f = aktueller Luftdruck (Torr) / 760 Torr) multipliziert. Der so ermittelte O_2-Gehalt wird am Meßgerät eingestellt.

3.3 Messung

Der Sauerstoffgehalt des Wassers vor und nach der Meßküvette wird mit Hilfe eines Schreibers kontinuierlich registriert. Das Verhalten des Tieres wird während des gesamten Versuchsablaufes protokolliert und in ca. 5-minütigen Abständen die Atemfrequenz des Fisches bestimmt.

Um den Einfluß des O_2-Angebots auf die Atemtätigkeit zu ermitteln, wird der Sauerstoffgehalt des Wassers im Vorratsgefäß durch Einblasen von Stickstoff in mindestens zwei Stufen vermindert.

3.4 Versuchsauswertung

Aus der Sauerstoffdifferenz, der Durchflußgeschwindigkeit und dem Tiergewicht läßt sich der Sauerstoffverbrauch des Fisches bestimmen:

$$V_{O_2} = \frac{D \cdot F \cdot U}{G} \quad (ml O_2\ g^{-1}\ h^{-1})$$

D = Differenz des O_2-Gehalts vor und nach dem Tiergefäß (mg O_2 l^{-1})

F = Durchflußgeschwindigkeit (l h^{-1})

U = Umrechnungsfaktor von mg O_2 in ml O_2

(1 Mol O_2 = 32 g = 22.4 l)

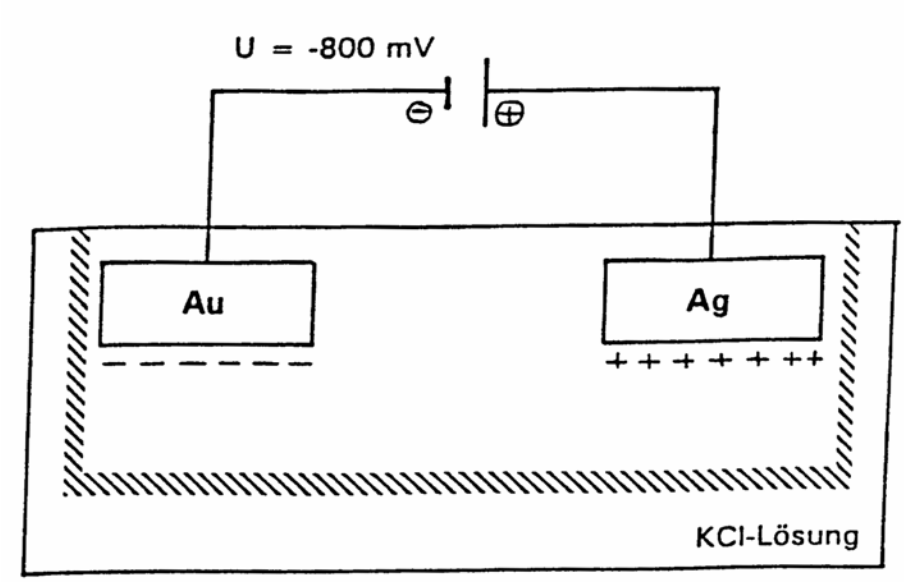
G = Körpergewicht des Fisches (g)

- Berechnen Sie den Sauerstoffverbrauch des Fisches pro Gramm und pro Tier!
- Stellen Sie den Sauerstoffverbrauch und die Atemfrequenz in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt graphisch dar!
- Welche Mechanismen sind an der Konstanthaltung des Sauerstoffverbrauchs beteiligt?
- Berechnen Sie aus dem Sauerstoffverbrauch den Energieverbrauch (in W und W g^{-1};J = W • s) des Fisches (20 J ml O_2^{-1}) und vergleichen Sie ihn mit dem Ruheumsatz beim Menschen!

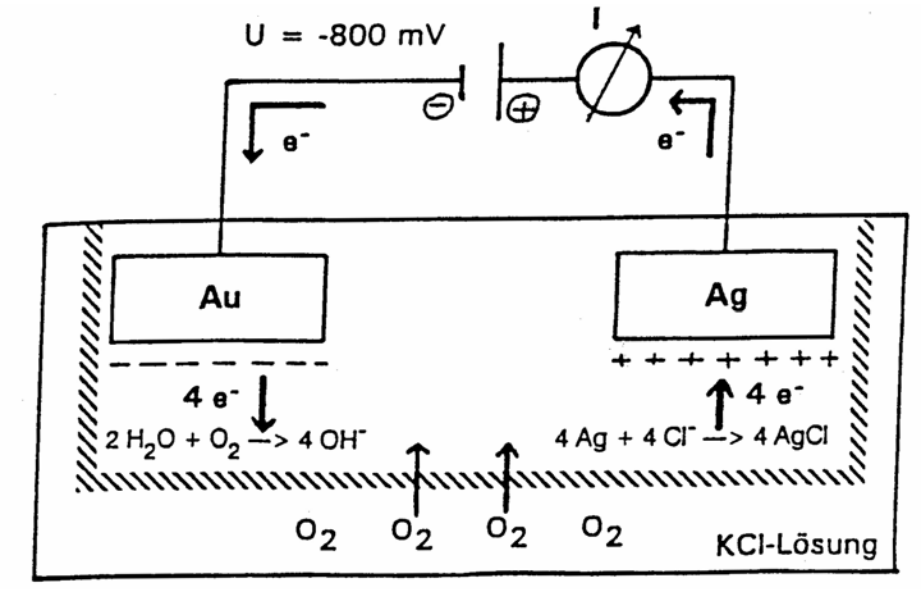
4 Anhang:

Funktionsprinzip der CLARK-Elektrode

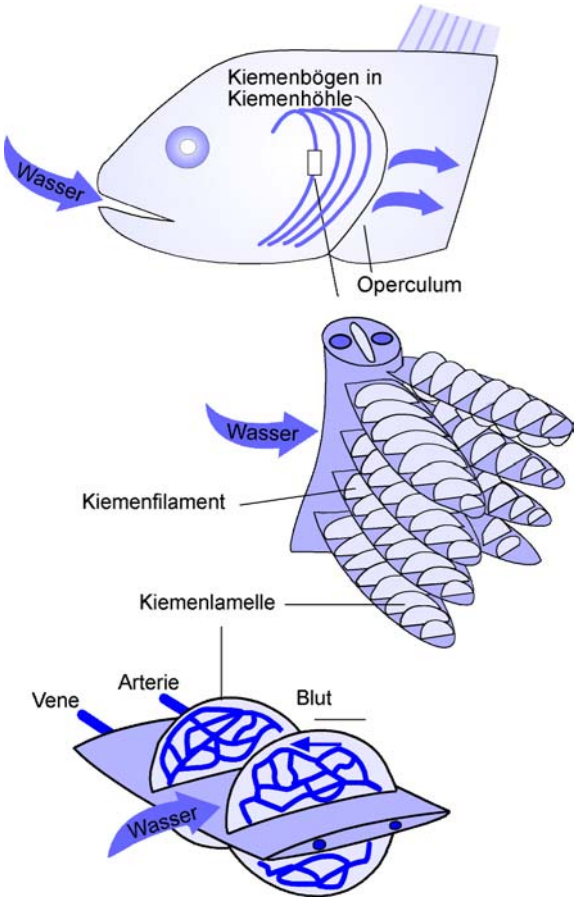
Die CLARK-Elektrode besteht aus einer Gold-Kathode und einer Silber-Anode, die über eine KCl-Lösung elektrolytisch miteinander in Verbindung stehen. Von der Probenlösung sind sie durch eine O_2-durchlässige Membranfolie abgetrennt. Die Gold-Kathode wird mit -800 mV Gleichstrom gegenüber der Silber-Anode polarisiert:



Bringt man nun in die Meßkammer eine O_2-haltige Probenlösung, so führt der O_2-Partialdruckunterschied zwischen Membranaußen- und innenseite zu einer O_2-Diffusion durch die Membranfolie. Der Sauerstoff wird an der Gold-Kathode reduziert. D.h., die Gold-Kathode gibt Elektronen an den Sauerstoff ab, wobei OH^--Ionen entstehen. An der Silber-Anode wird Silber zu Silberchlorid oxidiert:



Es ergibt sich somit ein Strom I, der dem Partialdruck des Sauerstoffes direkt proportional ist. Zu berücksichtigen ist dabei, daß die Diffusion des Sauerstoffes durch die Membranfolie und die Löslichkeit des Sauerstoffes in Wasser temperaturabhängig sind. Beide Faktoren werden jedoch durch zwei im Elektrodenkopf eingebaute Thermistoren automatisch kompensiert.



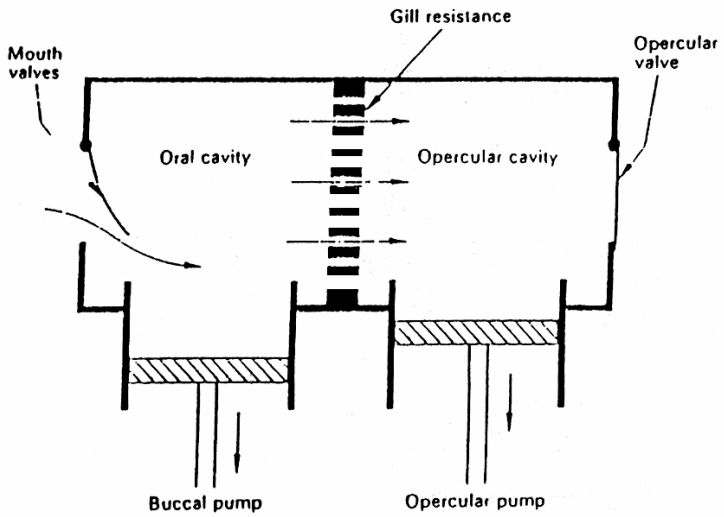
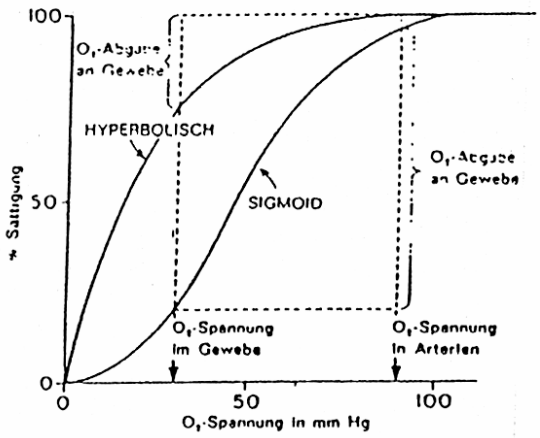
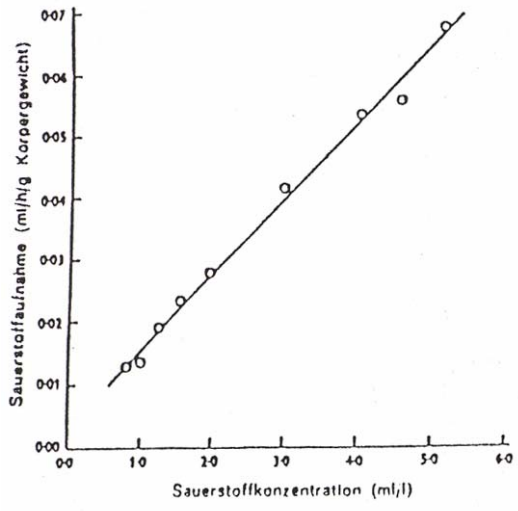


Fig. 1.6. Water is pumped over the gills of fish by a dual pumping system. With the aid of suitable valves the pumps provide a unidirectional flow of water over the gill surface (Hughes, 1960).



9-13 Dieses Schema einer hyperbolischen und einer sigmoiden Dissoziationskurve von zwei hypothetischen sauerstofftragenden Pigmenten veranschaulicht den deutlichen Unterschied in den von den jeweiligen Pigmenten im Körperinneren entladenen Mengen Sauerstoff. Um das tatsächliche Volumen des an die Gewebe abgelieferten Sauerstoffs zu ermitteln, muß man die O_2-Kapazität der pigmenthaltigen Körperflüssigkeit kennen und die Menge Sauerstoff, die pro Zeiteinheit die Gewebe erreicht; wird die »Sättigungsprozent«-Skala gegen eine »O_2-Kapazitätsprozent«-Skala ausgetauscht, so läßt sich der gesuchte Wert direkt aus der Kurve ablesen.



9-6 Sauerstoffverbrauch in Abhängigkeit von der äußeren Sauerstoff-Konzentration (-Spannung) beim Hummer Homarus vulgaris als Beispiel für abhängige Atmung. (Versuchstemperatur ist 15° C). (Aus Thomas, H. J.: The oxygen uptake of the lobster [Homarus vulgaris]. J. Exp. Biol. 31 [1954] 228 bis 251)

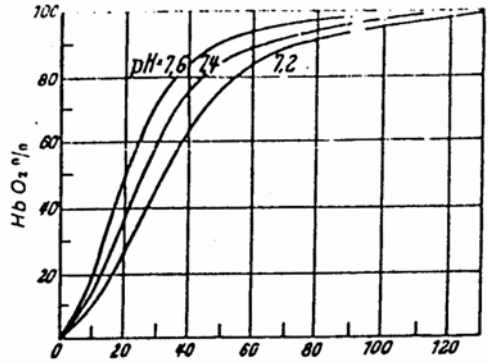


Abb. 11a

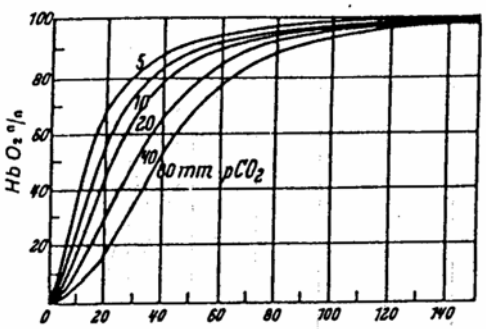


Abb. 11b

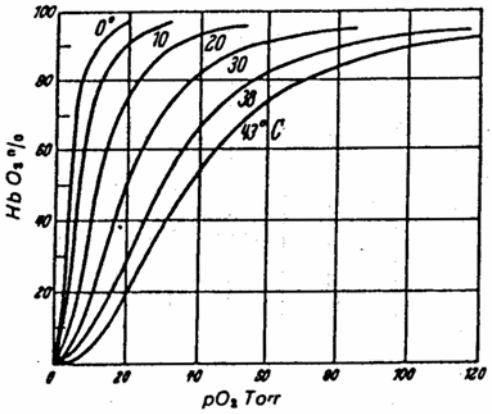


Abb. 11c

Abb. 11. O_2-Bindungskurven
a) bei verschiedenen pH-Werten,
b) bei verschiedenen CO_2-Drucken,
c) bei verschiedenen Temperaturen.

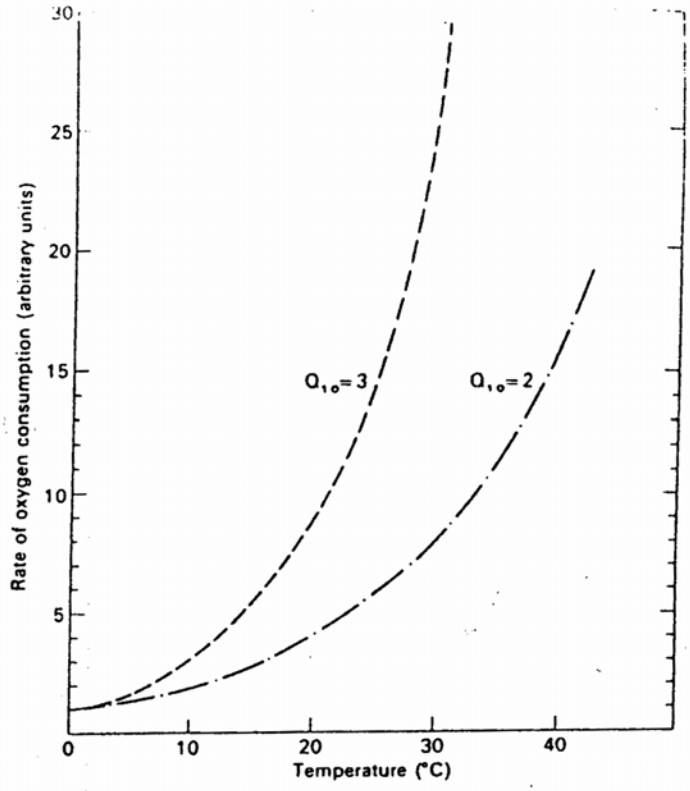
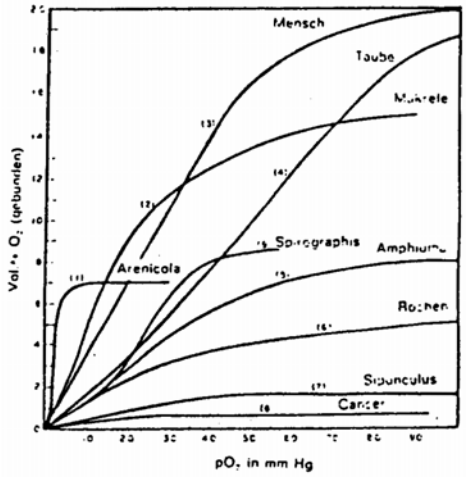
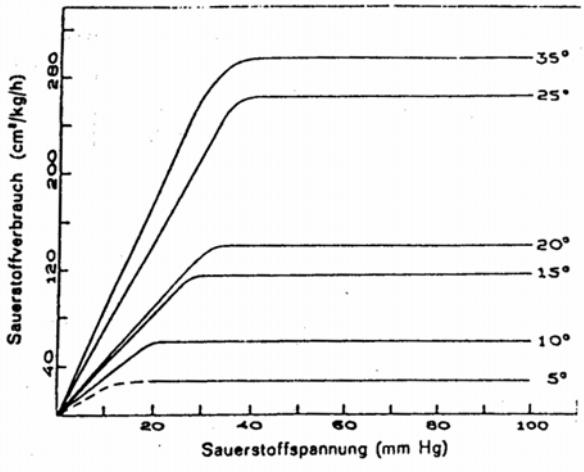


Fig. 7.1. Many temperature-dependent rate processes proceed more and more rapi as temperature increases. See text for further information.



9-19 O_2-Gleichgewichtskurven: Volumprozent von gebundenem Sauerstoff (in ml O_2/100ml Blut oder Zoiomflüssigkeit)als Funktion des O_2-Partialdruk-kes (in mm Hg). (1) Arenicola, 20° C, pH 4,9; (2) Makrele, 20° C, 1 mm CO_2; (3) Mensch, 38° C, pH 7,4; (4) Taube, 42° C, 40 mm CO_2; (5) Amphi-uma, 20° C, 43 mm CO_2; (6) Rochen, 10,4° C, pH 7,8. (7) Sipunculus, 19° C, pH 7,7; (8) Cancer, 23° C, 1 mm CO_2; (9) Spirographis, 20° C, pH 7,7. Im Gegensatz zu Dissoziationskurven, welche die prozentuale Sättigung angeben ohne Berücksich-tigung der tatsächlich gebunden vorliegenden Sauerstoffmenge, zeigen die Gleichgewichtskur-ven die »Transport-Leistung« der jeweiligen Kör-perflüssigkeit an. Man vergleiche die hier für Can-cer (8) dargestellte Kurve mit der Dissoziations-kurve von Panulirus (ebenfalls einem dekapoden Krebs) in Abb. 9-16. (Nach Redfield aus Prosser, C. L. u. F. A. Brown, Jr. [Hrsgb]: Comparative Animal Physiology, 2. Aufl., W. B. Saunders Co., Philadelphia 1961.)

9-7 Der Sauerstoffver-brauch des Goldfisches, ei-nes Tieres mit unabhängi-ger Atmung, ist (oberhalb eines bestimmten Minimal-wertes) unabhängig von der äußeren Sauerstoffspan-nung. Die Temperaturen, bei denen die Messungen durchgeführt wurden, sind jeweils im Bild angegeben. (Aus Fry, F. E. J. u. J. S. Hart: The relation of tem-perature to oxygen con-sumption in the goldfish. Biol. Bull. 94 [1948] 66—77.



TEIL 2: ATEMVOLUMINA UND MESSUNG DES ENERGIE-UMSATZES IN RUHE BEIM MENSCHEN

1 Einleitung

Mit Hilfe der Spirometrie soll dieser Versuch einen Einblick in die Atmungsphysiologie des Menschen geben. Neben der Ermittlung der verschiedenen Atemvolumina können zusätzlich noch Messungen des Ruheumsatzes durchgeführt werden. Sowohl die Bestimmungen der Atemvolumina als auch des Ruheumsatzes (Grundumsatzes) sind besonders in der klinischen Diagnostik von Bedeutung, um Erkrankungen der Atemwege und der Lunge bzw. z. B. Störungen der Schilddrüsenfunktion festzustellen.

2 Literatur

- Heldmaier G: Vergleichende Tierphysiologie, Bd. 2. Springer-Verlag.
- Schmidt RF, Thews G: Physiologie des Menschen. Springer-Verlag. Kapitel "Lungenatmung" und Kapitel "Energiehaushalt" (dabei besonders die Verfahren zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahme des Gesamtorganismus).
- Silbernagl Despopoulos: Taschenatlas der Physiologie, Thieme Verlag

3 Versuchsdurchführung

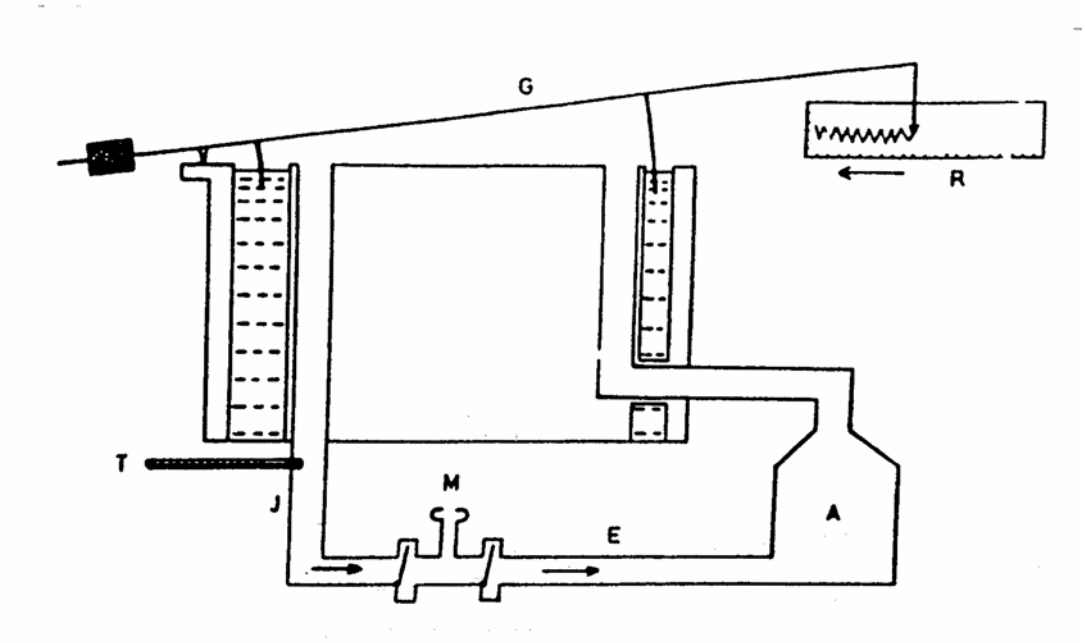
3.1 Versuchsprinzip

Aus einem mit normaler Luft gefülltem Spirometer entnimmt die Versuchsperson Einatemluft. Die Ausatemluft wird nach Absorption des Kohlendioxids in einem geschlossenen Kreislauf zum Spirometer zurückgeleitet. Über einen Winkelmesser an der Spirometerglocke wird die Atemkurve mit einem Schreiber registriert.

3.2 Beschreibung der Apparatur

Eine rechteckige Spirometerglocke (Krogh'sches Spirometer), welche durch ein Gegengewicht ausbalanciert ist, taucht in einen mit Wasser gefüllten Kasten. Die

Spirometerglocke wird durch den an der Rückwand befindlichen Einlaßstutzen unter geringem Druck mit Luft gefüllt. Die Spirometerglocke soll bei maximaler Füllung etwa 1 cm tief eintauchen. An das Spirometer schließt ein Schlauchsystem an, das aus zwei getrennten Wegen für Inspiration und Expiration besteht. Die Steuerung des Gasstromes erfolgt durch 2 Ventile, die in dem Mundstück sitzen. Bei der Expiration durchströmt die



G – Spirometerglocke, I – Weg für Inspiration, E – Weg für Expiration, M – Mundstück mit Ventilen, A – Flasche mit Atemkalk, R- Registriereinrichtung

Luft den Atemkalk (Natronkalk), in dem das Kohlendioxid absorbiert wird. Aus der Hubhöhe der Spirometerglocke kann auf dem Registrierpapier direkt die inspirierte und expirierte Gasmenge (1) abgelesen werden.

3.3 Versuchsdurchführung zur Messung des Energieumsatzes in Ruhe und der Atemvolumina:

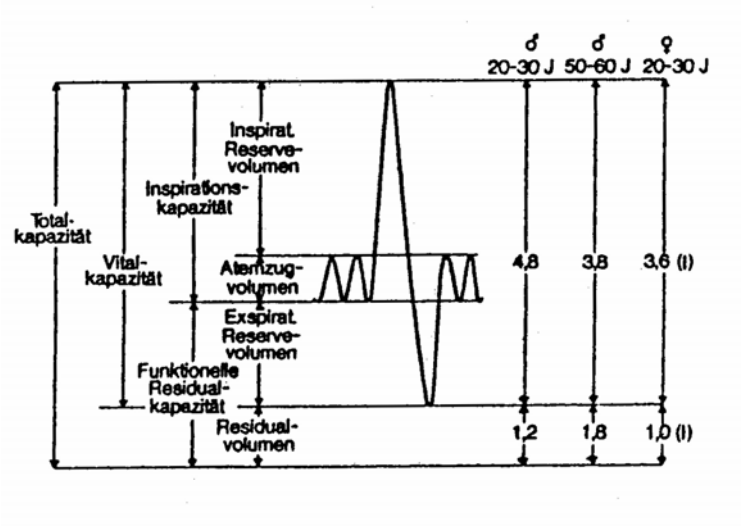
In diesem Versuch sollen Energieumsatz in Ruhe, Vitalkapazität, expiratorisches und inspiratorisches Reservevolumen, Atemzugvolumen, Atemminutenvolumen und Atemfrequenz bestimmt werden. Erklärung der Begriffe auf nachfolgender Skizze.
Nach ausreichender Füllung der Spirometerglocke mit Atemgas nimmt die Versuchsperson das Mundstück in den Mund. Nach Gewöhnung an die Ventilatmung wird etwa drei Minuten normal geatmet. Der Versuch lässt sich am besten auswerten, wenn

man einen gleichmäßig abfallenden Kurvenzug ohne wesentlichen Wechsel in der Tiefe der Atemzüge erhält.

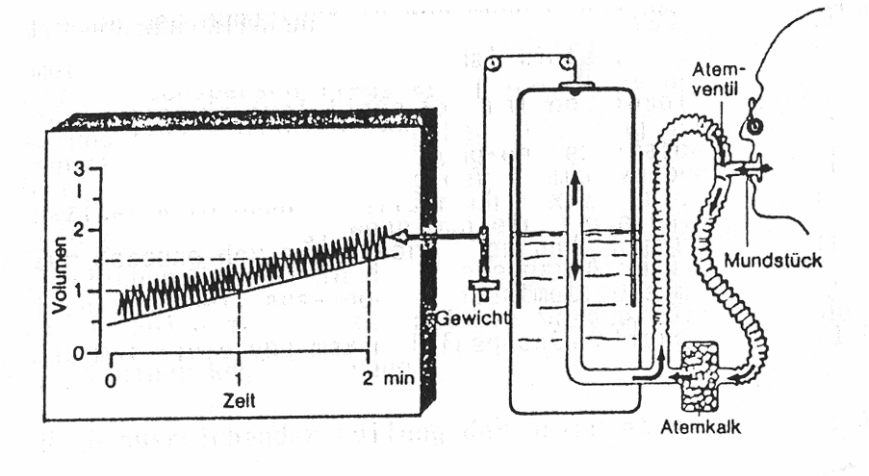
Zur Ermittlung des expiratorischen und inspiratorischen Reservevolumens und der Vitalkapazität wird dann jeweils nach maximal tiefer Inspiration maximal ausgeatmet.

Barometerdruck und Temperatur im Spirometer müssen notiert werden.

1. *Atemzugvolumen:* normales In- bzw. Expirationsvolumen;
2. *Inspiratorisches Reservevolumen:* Volumen, das nach normaler Inspiration noch zusätzlich eingeatmet werden kann.
3. *Exspiratorisches Reservevolumen:* Volumen, das nach normaler Exspiration noch zusätzlich eingeatmet werden kann.
4. *Residualvolumen*: Volumen, das nach maximaler Exspiration noch in der Lunge zurückbleibt.
5. *Vitalkapazität*: Volumen, das nach maximaler Inspiration maximal ausgeatmet werden kann = Summe aus 1, 2 und 3;
6. *Inspirationskapizität*: Volumen, das nach normaler Exspiration maximal eingeatmet werden kann = Summe aus 1 und 2;
7. *Funktionelle Residualkapizität*: Volumen, das nach normaler Exspiration noch in der Lunge enthalten ist = Summe aus 3 und 4;
8. *Totalkapitzität:* Volumen, das nach maximaler Inspiration in der Lunge enthalten ist = Summe aus 4 und 5;



Von diesen Größen kommt neben dem Atemzugvolumen nur der Vitalkapitzität und der funktionellen Residualkapizität eine größere Bedeutung zu.



Prinzip des *geschlossenen Systems* zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahme. Über einen Atemschlauch mit Ventil und Mundstück atmet die Versuchsperson aus einem Tauchglockengasometer (S.506) Sauerstoff ein. Die Ausatemluft wird durch einen Atemkalk - Behälter (CO_2 - Absorption) in die Spirometerglocke zurückgeleitet, wobei die Nase während des Versuchs mit einer Nasenklemme verschlossen ist. Die atemcyclischen Bewegungen der Glocke werden über ein Schreibsystem (Rollen, Schreibhebel, Gewicht) auf einem gleichmäßig bewegten Registrierpapier aufgezeichnet. Auf diese Weise erhält man ein Spirogramm. Legt man an dessen untere Umkehrpunkte einen Tangente, ist deren Steilheit (Anstieg in Liter pro Zeit) ein direktes maß für die Sauerstoffaufnahme, im Beispiel 0,5l / min.

3.4 Auswertung

Die unter aktuellen Bedingungen gemessene Sauerstoffaufnahme muss aus Standardbedingungen umgerechnet werden, damit die Meßergebnisse, unabhängig von Temperatur und Luftdruck vergleichbar werden. Als Normbedingungen gelten die sogenannten STPD - Bedingungen (Standard for Temperature, Pressure, Dry; d.h. 760 mmHg, 0°C, und Trockenheit).

Der Umrechnung liegt folgende Gleichung zugrunde (Vorsicht, Einheiten beachten!):

$$V_0 = V \cdot \frac{P_b - P_{H_2O}}{760} \cdot \frac{273}{273 + t}$$

V_0 = auf Standard - Bedingungen (STPD) reduziertes Volumen;
V = gemessenes Volumen; P_b = Barometerdruck;
P_{H_2O} = Wasserdampfdruck im Spirometer (s. Tabelle 2);
t = Temperatur des gemessenen Gasvolumens in °C
(1 mm Hg = 1 torr = 133,3 Pa = 0,133 kPa; 1bar = 100 kPa)

Der Sauerstoffverbrauch in Ruhe wird graphisch ermittelt. Die Neigung der registrierten Atemkurve wird bestimmt, indem man die inspiratorischen Umkehrpunkte durch eine gerade Linie verbindet. Mit Hilfe der Eichlinien für das Volumen auf dem Registrierpapier kann auf der Geraden der Sauerstoffverbrauch direkt abgelesen werden.
Aus dem respiratorisch bestimmten Sauerstoffverbrauch läßt sich die tatsächlich unter den vorgegebenen Bedingungen umgesetzte Kalorienmenge berechnen. Da in unserem Versuch die CO2 - Ausscheidung nicht mitbestimmt wurde, wird für die Berechnung ein RQ von 0.85 zugrundegelegt. Für diesen RQ wird nach der Tabelle 1 das kalorische Äquivalent für 1l Sauerstoff ermittelt. Aus dem im Versuch bestimmten O2 - Verbrauch pro Minute wird der Umsatz der Versuchsperson in kJ / 24 Stunden berechnet (1kcal = 4.19 kJ).

Vitalkapazität, expiratorisches und inspiratorisches Reservevolumen, Atemzugvolumen, Atemminutenvolumen und Atemfrequenz können ebenfalls auf dem Schreiberpapier abgelesen werden.

A: Atmung

Tabelle 1:

Respiratorischer Quotient	Prozentualer Anteil am Gesamt-Sauerstoffverbrauch		Prozentualer Anteil an der Gesamt-Kalorienerzeugung		kcal/Liter O_2 - Kalorisches Äquivalent	
	Kohlenhydrat	Fett	Kohlenhydrat	Fett		$\log_{10}$
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	
0,707	0	100,0	0	100,0	4,686	0,67080
0,71	1,02	99,0	1,10	98,9	4,690	0,67114
0,72	4,44	95,6	4,76	95,2	4,702	0,67228
0,73	7,85	92,2	8,40	91,6	4,714	0,67342
0,74	11,3	88,7	12,0	88,0	4,727	0,67456
0,75	14,7	85,3	15,6	84,4	4,739	0,67569
0,76	18,1	81,9	19,2	80,8	4,751	0,67682
0,77	21,5	78,5	22,8	77,2	4,764	0,67794
0,78	24,9	75,1	26,3	73,7	4,776	0,67906
0,79	28,3	71,7	29,9	70,1	4,788	0,68018
0,80	31,7	68,3	33,4	66,6	4,801	0,68129
0,81	35,2	64,8	36,9	63,1	4,813	0,68241
0,82	38,6	61,4	40,3	59,7	4,825	0,68352
0,83	42,0	58,0	43,8	56,2	4,838	0,68463
0,84	45,4	54,6	47,2	52,8	4,850	0,68573
0,85	48,8	51,2	50,7	49,3	4,862	0,68683
0,86	52,2	47,8	54,1	45,9	4,875	0,68793
0,87	55,6	44,4	57,5	42,5	4,887	0,68903
0,88	59,0	41,0	60,8	39,2	4,899	0,69012
0,89	62,5	37,5	64,2	35,8	4,911	0,69121
0,90	65,9	34,1	67,5	32,5	4,924	0,69230
0,91	69,3	30,7	70,8	29,2	4,936	0,69339
0,92	72,7	27,3	74,1	25,9	4,948	0,69447
0,93	76,1	23,9	77,4	22,6	4,961	0,69555
0,94	79,5	20,5	80,7	19,3	4,973	0,69663
0,95	82,9	17,1	84,0	16,0	4,985	0,69770
0,96	86,3	13,7	87,2	12,8	4,998	0,69877
0,97	89,8	10,2	90,4	9,58	5,010	0,69984
0,98	93,2	6,83	93,6	6,37	5,022	0,70091
0,99	96,6	3,41	96,8	3,18	5,035	0,70197
1,00	100,0	0	100,0	0	5,047	0,70303

Gleichungen:

Kolonne 1: $\mathrm{Pr}ozente = 100 \cdot \frac{RQ - 0{,}707}{0{,}293}$

Kolonne 2: $\mathrm{Pr}ozente = 100 \cdot \frac{1 - RQ}{0{,}293}$

Kolonne 3: $\mathrm{Pr}ozente = \frac{504{,}7 \cdot (RQ - 0{,}707)}{5{,}047 \cdot (RQ - 0{,}707) + 4{,}686 \cdot (1 - RQ)}$

Kolonne 4: $\mathrm{Pr}ozente = \frac{468{,}6 \cdot (1 - RQ)}{5{,}047 \cdot (RQ - 0{,}707) + 4{,}686 \cdot (1 - RQ)}$

Kolonne 5: $Kalorien = 4{,}686 + \frac{RQ - 0{,}707}{0{,}293} \cdot 0{,}361$

Tabelle 2:

Sättigungsdampfdruck des Wasserdampfes in mm Hg von 0°C, von 10°-40°

Grade	Zehntelgrade									
	.0	.1	.2	.3	.4	.5	.6	.7	.8	.9
10	9,209	9,271	9,333	9,395	9,458	9,521	9,585	9,649	9,714	9,779
11	9,844	9,910	9,976	10,042	10,109	10,176	10,244	10,312	10,380	10,449
12	10,518	10,588	10,658	10,728	10,799	10,870	10,941	11,013	11,085	11,158
13	11,231	11,305	11,379	11,453	11,528	11,604	11,680	11,756	11,833	11,910
14	11,987	12,065	12,144	12,223	12,302	12,382	12,462	12,543	12,624	12,706
15	12,788	12,870	12,953	13,037	13,121	13,205	13,290	13,375	13,461	13,547
16	13,634	13,721	13,809	13,898	13,987	14,076	14,166	14,256	13,347	14,438
17	14,530	14,622	14,715	14,809	14,903	14,997	15,092	15,188	15,284	15,380
18	15,477	15,575	15,673	15,772	15,871	15,971	16,071	16,171	16,272	16,374
19	16,477	16,581	16,685	16,789	16,894	16,999	17,105	17,212	17,319	17,742
20	17,535	17,644	17,753	17,863	17,974	18,086	18,197	18,309	18,422	18,536
21	18,650	18,765	18,880	18,996	19,113	19,231	19,349	19,468	19,587	19,707
22	19,827	19,948	20,070	20,193	20,316	20,440	20,565	20,690	20,815	20,941
23	21,068	21,196	21,324	21,453	21,583	21,714	21,845	21,977	22,110	22,243
24	22,377	22,512	22,648	22,785	22,922	23,060	23,198	23,337	23,476	23,616
25	23,756	23,897	24,039	24,182	24,326	24,471	24,617	24,764	24,912	25,060
26	25,209	25,359	25,509	25,660	25,812	25,964	26,117	26,271	26,426	26,582
27	26,739	26,897	27,055	27,214	27,374	27,535	27,696	27,858	28,021	28,185
28	28,349	28,514	28,680	28,847	29,015	29,184	29,354	29,525	29,697	29,870
29	30,043	30,217	30,392	30,568	30,745	30,923	31,102	31,281	31,461	31,642
30	31,824	32,007	32,191	32,376	32,561	32,747	32,934	33,122	33,312	33,503
31	33,605	33,888	34,082	34,276	34,471	34,667	34,864	35,062	35,261	35,462
32	35,663	35,865	36,068	36,272	36,477	36,683	36,891	37,099	37,308	37,518
33	37,729	37,942	38,155	38,369	38,584	38,801	39,018	39,237	39,457	39,677
34	39,898	40,121	40,344	40,596	40,796	41,023	41,251	41,480	41,710	41,942
35	42,175	42,409	42,644	42,880	43,117	43,355	43,595	43,836	44,078	44,320
36	44,563	44,808	45,054	45,301	45,549	45,799	46,050	46,302	46,556	46,811
37	47,067	47,324	47,582	47,841	48,102	48,364	48,627	48,981	49,157	49,424
38	49,692	49,961	50,231	50,502	50,774	51,048	51,323	51,600	51,879	52,160
39	52,442	52,726	53,009	53,294	53,580	53,867	54,156	54,446	54,737	55,030
40	55,324	55,61	55,91	56,51	56,51	56,81	57,11	57,41	57,72	58,03

KURS B: BLUT

BESTANDTEILE UND FUNKTIONEN DES BLUTES

1 Einleitung

Zu den Hauptaufgaben des Blutes gehören

- der Transport zahlreicher Stoffe (Atemgase, Nährstoffe, Stoffwechselprodukte)
- homöostatische Funktionen (Regulation der Wärmabgabe, Konstanthaltung des pH-Wertes)
- die Signalübermittlung (Hormone)
- die Abwehr körperfremder Stoffe durch phagozytierende und Antikörper-bildende Blutzellen (Leukozyten)

In diesem Kurs sollen einige der genannten Funktionen des Säugerblutes mit verschiedenen Testverfahren untersucht werden.

2 Grundkenntnisse

- Zusammensetzung und Funktionen des Blutes
- Blutzellen und deren Aufgaben
- Serumproteine (Aminosäuren, Peptidbindungen, isoelektrischer Punkt, Analyseverfahren, physiologische Bedeutung)
- Blutgruppen (AB0, Rh, Vererbung, geographische Verteilung)
- Hämoglobin (Aufbau, Eigenschaften, Bindungskurven)
- Grundlagen der Immunabwehr
- Mechanismus der Blutgerinnung
- Prinzip der Photometrie, Lambert-Beersches-Gesetz

2.1 Literatur zur Vorbereitung

- Emmerich H: Stoffwechselphysiologisches Praktikum (Kapitel "Respira-torische Farbstoffe, Körperflüssigkeiten, Analysenmethoden"). Thieme-Verlag
- Heldmaier G, Neuweiler G: Vergleichende Tierphysiologie, Bd. 2 Vegetative Physiologie. Springer-Verlag

und alternativ:

- Schmidt RF, Thews G: Physiologie des Menschen. Springer-Verlag
- Schmidt-Nielsen K: Animal Physiology. Cambridge University Press

bei weiterem Interesse:

- Stryer L: Biochemie (Kapitel "Hämoglobin"). Spektrum der Wissenschaft Verlag
- von Boehmer H, Kisielow P: Selbst-Erkenntnis des Immunsystems. Spektrum der Wissenschaft 1/92: 36-44
- Buisseret PD: Allergie: Wenn die Immunabwehr Fehler macht. Spektrum der Wissenschaft 10/82: 26 (Scientific American 8/82: 82)
- Doolittle RF: Fibrinogen: Hauptakteur bei der Blutgerinnung. Spektrum der Wissenschaft 2/82: 58 (Scientific American 12/81: 92)
- Golde DW, Gasson JC: Blutbildende Hormone. Spektrum der Wissenschaft 9/88: 70 (Scientific American 7/88: 34)
- Perutz MF: Struktur des Hämoglobins und Transportvorgänge bei der Atmung. Spektrum der Wissenschaft 2/79: 18 (Scientific American 12/78: 68)
- Tonegawa S: Die Moleküle des Immunsystems. Spektrum der Wissenschaft 12/85: 116 (Scientific American 10/85: 104)
- Young JD, Cohn ZA: Wie Killerzellen töten. Spektrum der Wissenschaft 3/88: 86 (Scientific American 1/88: 28)
- Zucker MB: Die Blutplättchen. Spektrum der Wissenschaft 8/80: 22 (Scientific American 6/80: 70)

3 Versuche

3.1 Kurzzeitelektrophorese von Serum auf Celluloseacetat-Folie

Blut besteht aus Blutplasma und den darin suspendierten zellulären Bestandteilen, d.h. den roten und weißen Blutzellen (Erythrozyten und Leukozyten) und den Blutplättchen (Thrombozyten). Der Anteil der Blutzellen am Blutvolumen wird Hämatokrit genannt; er beträgt beim Mann im Normalfall 44 - 46 Vol% und bei der Frau 41 - 43 Vol%. Nach Ausfällung des für die Gerinnung verantwortlichen Fibrinogens wird die flüssige Phase als Serum bezeichnet.

Eine wichtige Methode zur Analyse der im Serum enthaltenen Proteine ist die Elektrophorese, die auf folgendem Prinzip beruht: Legt man an eine Proteinlösung ein elektrisches Feld an, wandern die Protein-Ionen bei negativer Summenladung zur Anode, bei positiver Summenladung zur Kathode. Die Wanderungsgeschwindigkeit und -richtung ist dabei abhängig von der Ladungsgröße der Proteine und dem pH-Wert der Pufferlösung.

3.1.1 Versuchsdurchführung

Eine Probe Humanserum wird auf Celluloseacetat-Folie aufgetrennt. Als Puffer dient 40 mM Tris-Acetat-Puffer, pH 8.6.

1. Celluloseacetat-Streifen 1-2 Minuten mit Puffer tränken. Folien flach auf die Pufferlösung fallen lassen und erst nach völliger Benetzung vorsichtig mit der Pinzette untertauchen.
2. Elektrophoresekammern bis zu den Strichmarken mit Puffer füllen.
3. Streifen zwischen Filterpapier abtupfen (nicht mit den Fingern anfassen!) und auf die Trägerbrücke aufziehen. Brücke in die Kammer einsetzen.
4. Serumprobe mit einem Deckgläschen, dessen Schmalkante vorher in Serum getaucht wurde, auftragen. (Auf welcher Elektrodenseite bei pH 8.6?)
5. Kammerdeckel schließen, erst dann Elektrodenkabel mit dem Netzgerät verbinden (auf gleiche Farbe achten, Polung!). Gerät einschalten, 210 V Gleichspannung (bei constant-voltage) einstellen, mA-Wert notieren, auch während der Trennung kontrollieren. Dauer: 45 Minuten.

6. Farbbad: 5 Minuten

   0.5 g Amidoschwarz in 45 ml Ethanol + 45 ml Aqua dest. + 10 ml 100% Essigsäure

7. Entfärbung: 3 x 2-3 Minuten

   475 ml Ethanol + 475 ml Aqua dest. + 50 ml 100% Essigsäure (leichtes Schwenken des Gefäßes erleichtert die Entfärbung)

8. Entwässerung: exakt 30 Sekunden

   100 ml reines Ethanol

9. Transparenzbad: exakt 2 Minuten

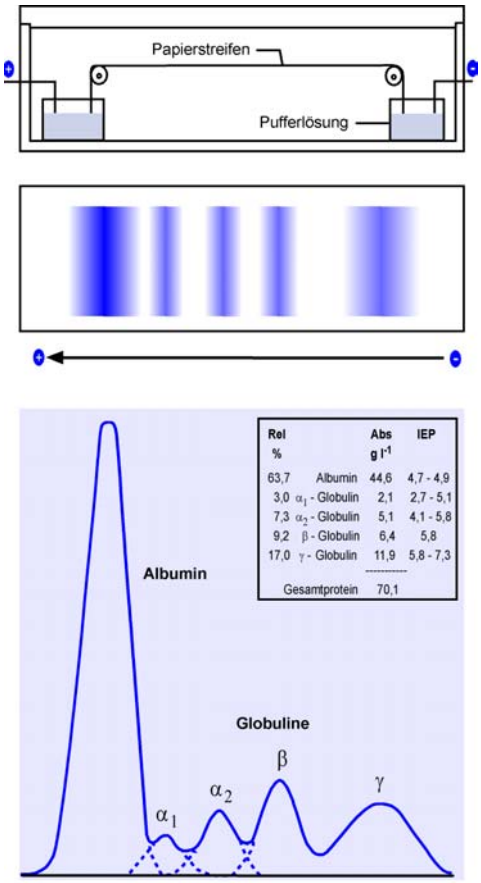
   86 ml Ethanol + 14 ml 100% Essigsäure (immer frisch ansetzen)

10. Trocknen

    Die Streifen werden aus dem Transparenzbad herausgenommen und luftblasenfrei auf einen Objektträger aufgezogen. Die überstehenden Enden des Streifens reißt man an der Glaskante ab. Bei 100°C werden die schräg aufgestellten Streifen im Trockenschrank unter Beobachtung 2-3 Minuten getrocknet, bis sie transparent sind.

11. Auswertung

    Extinktionsmessung im Photometer und daran angeschlossenem Schreiber bei 546 nm



Elektropherogramm eines menschlichen Serums.
Unten der angefärbte Papierstreifen, darüber die Photometerkurven, der prozentuale Anteil der einzelnen Plasmaeiweiß-raktionen und die Apparatur zur Papierelektrophorese
(aus Heldmaier: Tierphysiologie)

Tabelle 16-3. Proteinfraktionen des menschlichen Blutplasmas. MG = Molekulargewicht; IP = Isoelektrischer Punkt. Nach [16, 18, 24, 31]

Proteinfraktion		Mittlere Konzentration		MG (×1000)	IP	Physiologische Bedeutung
elektrophoretisch	immunelektrophoretisch	mg/dl	µmol/l			
Albumin	Präalbumin	30	4,9	61	4,7	Begrenzte Bindung von Thyroxin;
	Albumin	4000	579,0	69	4,9	kolloidosm. Druck, Vehikel-Funktion; Reserve-Eiweiß
α_1-Globuline	Saures α_1-Glykoprotein	80	18,2	44	2,7	Gewebsabbauprodukt?;
	α_1-Lipoprotein	350	17,5	200	5,1	Lipidtransport (bevorzugt Phospholipide)
α_2-Globuline	Coeruloplasmin	30	1,9	160	4,4	Oxidase-Aktivität;
	α_2-Makroglobulin	250	3,1	820	5,4	Plasmin- und Proteinasen-Inhibition;
	α_2-Haptoglobulin	100	11,8	85	4,1	Nichtharnfähige Hämoglobin-Bindung
β-Globuline	Transferrin	300	33,3	90	5,8	Eisentransport;
	β-Lipoprotein	550	0,3 bis 1,8	3000 bis 20000	–	Transport von Lipiden (bevorzugt Cholesterin)
	Fibrinogen	400	11,8	340	5,8	Blutgerinnung
γ-Globuline						Immunglobuline
	γG-Globuline	1200	76,9	156	5,8	Antikörper gegen bakterielle Antigene und körperfremdes Protein;
	γA-Globulin	240	16,0	150	7,3	
	γM-Globulin	125	1,3	960		„Natürliche" Antikörper, z.B. Isohämagglutinine:
	γE-Globulin	0,03	0,002	190	–	Antikörper

(aus Schmidt, Thews: Physiologie des Menschen)

3.1.2 Versuchsauswertung

- Die bei der photometrischen Auswertung erhaltene Kurve wird ausgeschnitten. Die den einzelnen Kurventeilen entsprechenden Proteinfraktionen erhält man in ihrer prozentualen Aufteilung, indem die Fläche unter den Kurventeilen durch Auszählen der Kästchen ausgemessen wird.
- Diskutiert die Ergebnisse im Vergleich mit Literaturwerten!

3.2 Blutgruppenbestimmung: AB0- und Rh- System

Das Blut jedes Menschen ist durch einen bestimmten Satz spezifischer Erythrozyten-Antigene charakterisiert. Unter den vielen bisher nachgewiesenen Antigenen lösen rund 30 relativ heftige Reaktionen bei Kontakt mit dem spezifischen Antikörper aus. Zu den wichtigsten Systemen gehören das ABO- und Rh-System; beide besitzen besondere Bedeutung in der medizinischen Praxis. Im AB0-System können menschliche Erythrozyten 4 verschiedene Antigen-Eigenschaften haben: A, B, AB und 0. Das Serum von Menschen mit diesen Blutgruppen enthält jeweils nur agglutinierende Antikörper, die **nicht** gegen die eigenen Erythrozyten gerichtet sind. Die Rh-Eigenschaft der Erythrozyten wird durch mehrere Antigene bestimmt, von denen die wichtigsten C, D, E, c und e sind. Da Antigen D die größte antigene Wirksamkeit besitzt, wird Blut mit D-Erythrozyten als Rh-positiv und bei Fehlen dieser Eigenschaft als Rh-negativ bezeichnet.

3.2.1 Versuchsdurchführung

In 4 Löcher der Testplatte wird je 1 Tropfen Testserum (Anti-A, Anti-B, Anti-AB, Anti-D) aufgetragen. Es wird je 1 Tropfen Blut dazugegeben und mit jeweils einer neuen Pipettenspitze vermischt. Die Testplatte mit dem Anti-D-Tropfen muß für ca. 15 Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert werden. Um eine Austrocknung zu verhindern, wird die Testplatte dabei in eine mit feuchtem Filterpapier ausgelegte Petrischale mit Deckel gelegt.

3.2.2 Versuchsauswertung

- Notieren Sie die auftretenden Agglutinationen! (Betrachtung unter dem Mikroskop)

- Welche Blutgruppe liegt vor?

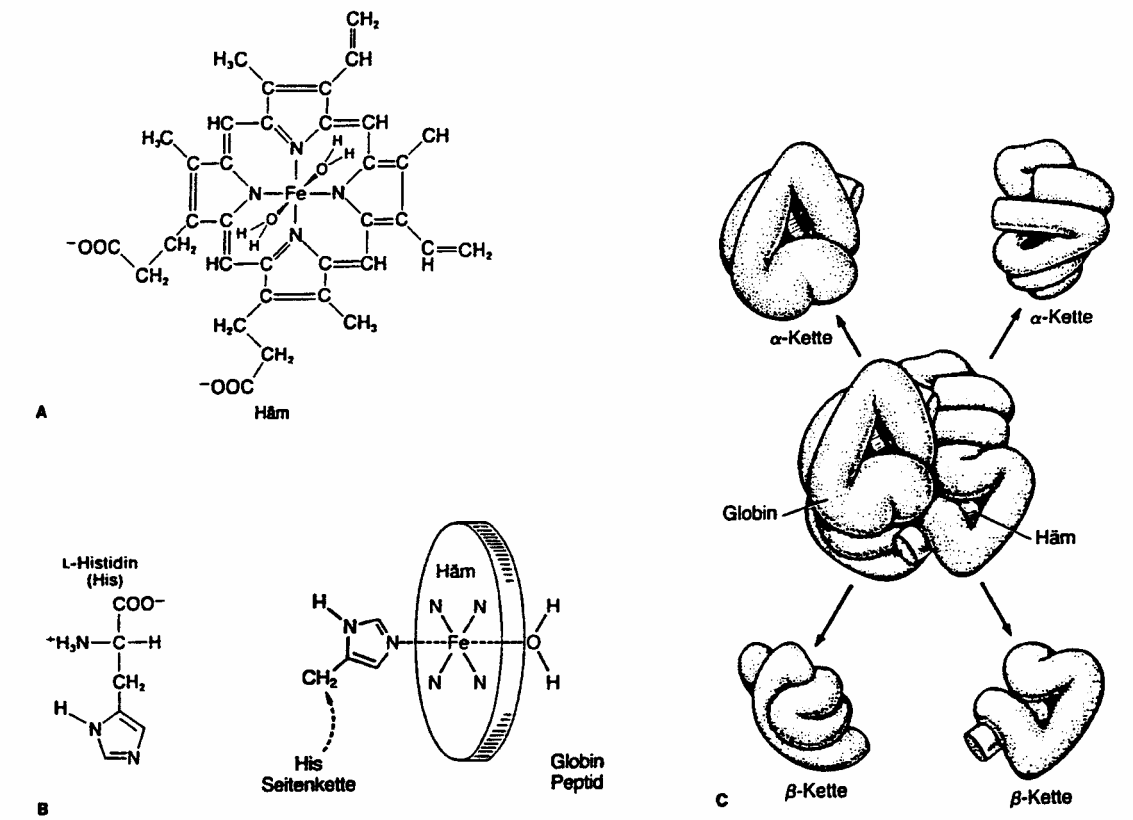


Abb. 14.2 **A** Zusammenlagerung eines Eisen-Ions und Protoporphyrin IX zu Häm. **B** Schematische Darstellung des Häm, das in einer aus dem Globulinmolekül gebildeten Tasche eingebettet liegt. Eine Histidylseitenkette des Globulins fungiert als zusätzlicher Ligand für das Eisenatom im Häm. **C** Eine „idealisierte" räumliche Darstellung des Hämoglobinmoleküls. Zwei der vier Hämgruppen sind in den von den gefalteten Peptidketten gebildeten Taschen sichtbar (nach *McGilvery* 1970).

(AUS ECKERT: TIERPHYSIOLOGIE)

3.3 Bestimmung des Hämoglobingehalts im Blut

Für die routinemäßige Hämoglobin-Bestimmung eignet sich hauptsächlich das spektralphotometrische Verfahren. Das Prinzip dieses Verfahrens besteht darin, daß die Hb-Konzentration über die Extinktionsmessung mit monochromatischem Licht bestimmt wird. Da verdünntes Hb wenig beständig ist und zudem seine Extinktion mit der O_2-Beladung ändert, ist zuvor die Umwandlung in eine farbstabile und haltbare Verbindung notwendig, das Hämiglobincyanid (Cyan-Methämoglobin, HbCN mit dreiwertigem Eisen).

$$Hb(Fe^{2+}) \xrightarrow{K_3[Fe(CN)_6]} Hb(Fe^{3+}) \xrightarrow{KCN} HB(Fe^{3+}) - CN$$

3.3.1 Versuchsdurchführung

1. In ein Reagenzglas werden 5 ml Reaktionslösung (**Vorsicht, giftig!** Enthält Kaliumcyanid, Kaliumhexacyanoferrat (III), Puffer pH 7.2) mit 0.02 ml Blut aus der Fingerbeere gemischt
2. Lösung bei 20-25°C inkubieren
3. Frühestens nach 3 Minuten die Extinktion der Probe gegen Reaktionslösung im Spektralphotometer bei 546 nm messen
4. Berechnung der Hämoglobinkonzentration (g/100 ml) mit Hilfe der Lambert-Beer-schen Gleichung:

$$c = \frac{E}{e \cdot d} \qquad \text{mit} \quad e = 44 * 10^6\ cm^2/mol,\ d = 1\ cm,\ MW_{(Hb)} = 64\,500\ g/mol$$

3.3.2 Versuchsauswertung

- Berechnet den Hämoglobingehalt (g/100 ml) und vergleicht ihn mit Literaturwerten!
- Welche Faktoren können den Hämoglobingehalt beeinflussen?

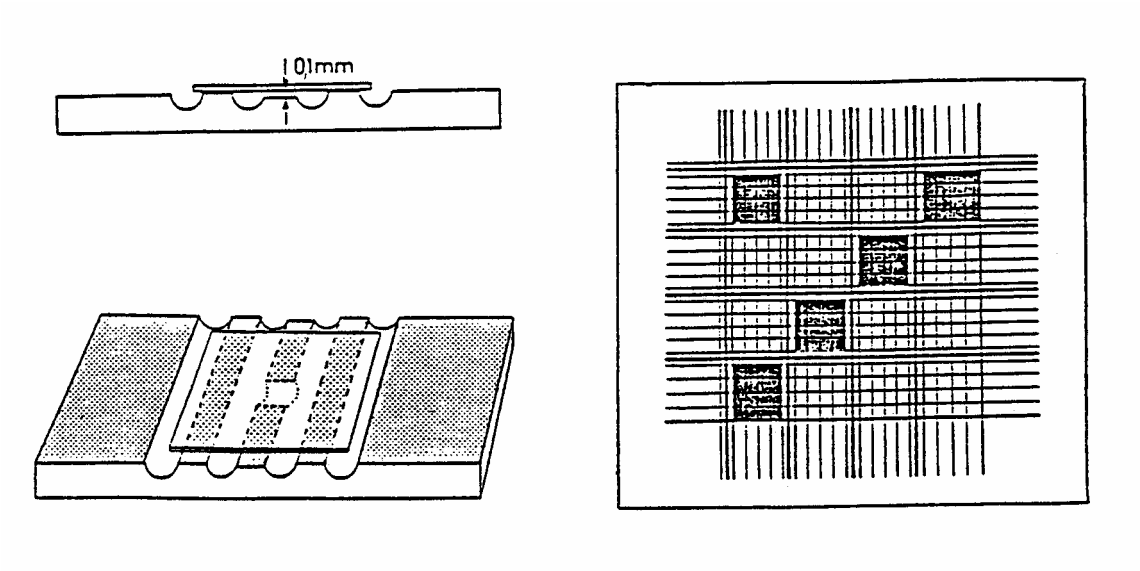
3.4 Bestimmung des Hämatokritwertes im Blut

Der Hämatokritwert bezeichnet den prozentualen Anteil der Blutzellen am Blutvolumen. Zur Hämatokritbestimmung werden die spezifisch schwereren Blutzellen durch 10 Minuten zentrifugieren bei etwa 1000 g in standardisierten Hämatokritröhrchen vom Plasma getrennt.

Vergleicht die Ergebnisse mit den Literaturwerten. Wodurch kann der Hämatokritwert beeinflußt werden?

3.5 Bestimmung der Erythrozytenzahl

Zur Bestimmung der Erythrozytenzahl in der Zählkammer nach Thoma wird frisches Blut 1:200 mit isotonischer NaCl verdünnt (gut durchmischen!).



Zählnetz nach Thoma

Man zählt alle Erythrozyten innerhalb der Kleinstquadrate und notiert die Anzahl pro Gruppenquadrat (=16 Kleinstquadrate). 1 Gruppenquadrat hat ein Volumen von 0,004 mm^3. Man zählt 5 solcher Gruppenquadrate aus (d.h. 0.02 mm^3). Berechnen Sie die Anzahl der Erythrozyten pro µl. (Verdünnungsfaktor nicht vergessen!) Die Ergebnisse werden in Millionen Erythrozyten/µl Blut angegeben. Vergleichen Sie Ihre Ergebnisse mit den Literaturwerten. Wodurch kann die Erythrozytenzahl beeinflußt werden?

3.6 Berechnung:

mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt (**MCH**)
mittleres korpuskuläres Volumen (**MCV**)
mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (**MCHC**)

Diese erythrozytometrischen Parameter können aus dem Hämoglobingehalt, der Erythrozytenzahl und dem Hämatokritwert berechnet werden.

3.6.1 Berechnung des MCH (Hämoglobingehalt eines Erythrozyten)

MCH (pg Hämoglobin / Erythrocyt) = $\frac{Hämoglobin(pg/l)}{Erythrozytenzahl/l}$

3.6.2 Berechnung des MCV Volumen eines Erythrozyten)

MCV (μm^3) = $\frac{Hämatokritwert(l/l)}{Erythrozytenzahl/l}$

3.6.3 Berechnung des MCHC

Der MCHC-WErt gibt den Hämoglobingehalt in Bezug auf das Gesamterythrozytenvolumen (Hämatokritwert) an. Als konventionelle Einheit gilt die Angabe in Hb/100 ml Erythrozyten.

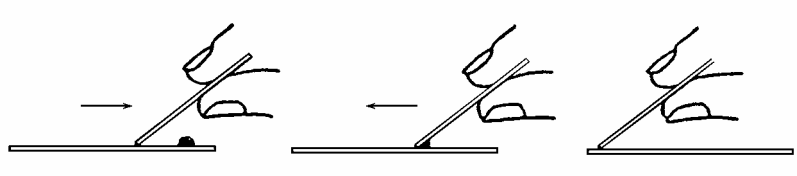
MCHC = $\frac{Hämoglobin(g/100ml)}{Hämatokritwert(l/l)}$

Vergleichen Sie Ihre errechneten Werte mit den Literaturwerten. Wodurch können die einzelnen Parameter beeinflußt werden?

3.7 Blutausstrich

3.7.1 Versuchsdurchführung

1. Blutausstrich auf einem Objektträger herstellen und trocknen lassen.



2. 3 Minuten mit 0.5 ml May-Grünwald-Lösung (Merck) bedecken.
3. Lösung nicht abkippen, sondern 0.5 ml Phosphatpuffer pH 7.2 dazugeben und weitere 1-2 Minuten einwirken lassen.
4. Farblösung abkipppen.
5. 15-20 Minuten mit frisch hergestellter Giemsas-Gebrauchslösung bedecken (10 Tropfen Giemsas-Lösung (Merck) auf 10 ml Phosphatpuffer pH 7.2).
6. mit Phosphatpuffer pH 7.2 gut von der Seite her abspülen
7. Blutausstrich trocknen lassen.

3.7.2 Versuchsauswertung

- Versucht so viele Leukozytentypen wie möglich zu identifizieren!
- Schätzt das Verhältnis von Leukozyten und Erythrozyten ab!
- Wodurch wird die Zahl der Leukozyten beeinflußt?

3.8 Anhang: Normalwerte des Blutes beim Menschen

Leucocyten

Erwachsene 4000 - 10000 /µl ($4 * 10^9$ - $10 * 10^9$/l)

Erythrocyten

Männer $4{,}5 * 10^6$ - $6 * 10^6$ / µl ($4{,}5 * 10^{12}$ - $6 * 10^{12}$/l)

Frauen $4 * 10^6$ - $5{,}4 * 10^6$ / µl ($4 * 10^{12}$ - $5{,}4 * 10^{12}$/l)

Reticolocyten

Erwachsene 7 - 15/1000 Erythrocyten (0,007 - 0,015)

entsprechen 35000 - 75000 Retikolocyten /l Blut

Hämatokrit

Männer 40 - 54 % (0,4 - 0,54 l/l)

Frauen 37 - 47 % (0,37 - 0,47 l/l)

Hämoglobin

Männer 10 - 20 Jahre 12 - 17 g/100 ml (120 - 170 g/l)

20 - 40 Jahre 13 - 18 g/100 ml (130 - 180 g/l)

> 40 Jahre 14 - 17 g/100 ml (140 - 170 g/l)

im Schnitt 16 g/100 ml (160 g/l)

Frauen 10 - 20 Jahre 12 - 16 g/100 ml (120 - 160 g/l)

20 - 40 Jahre 12 - 17,5 g/100 ml (120 - 175 g/l)

> 40 Jahre 12,7 - 16 g/100 ml (127 - 160 g/l)

im Schnitt 14,4 g/100 ml (140 g/l)

Mittleres Erythrocytenvolumen (MCV)

82 - 96 fl

Mittleres Korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC)

320 - 360 g/l Erythrocyten

Mittleres Korpuskuläres Hämoglobin (MCH)

28 - 34 pg

KURS C: HERZPHYSIOLOGIE

EIGENSCHAFTEN DES MYOGENEN HERZENS

Einleitung

Der Austausch von Stoffen mit der Umgebung erfolgt bei genügend kleinen Tieren allein durch Diffusion und Osmose. Größere Tiere hingegen benötigen Kreislaufsysteme, um Stoffe an die Körperzellen heran zu führen und abzutransportieren. In die Kreislaufsysteme sind Abschnitte eingeschaltet, die durch rhythmische Kontraktionen das Blut in Bewegung halten. Diese Organe werden als Herzen bezeichnet. Die rhythmischen Kontraktionen werden von Schrittmachern ausgelöst. Beim myogenen Herz wirken autorhythmische Zentren (modifizierte Muskelzellen) im Herz als Schrittmacher, während beim neurogenen Herz (meist im ZNS aktivierte) aufgelagerte Herzganglienzellen die rhythmischen Kontraktionen auslösen. Im Gegensatz zum myogenen Herz werden im neurogenen Herz die Erregungen nicht von einer Muskelzelle zur anderen direkt übertragen.

In diesem Versuchsabschnitt sollen im Eigenversuch einige Eigenschaften von myogenen Herzen mit nicht-invasiven Methoden kennen gelernt werden. Hierzu soll die Wirkung von körperlicher Aktivität auf Puls, Blutdruck und EKG-Muster beim Menschen untersucht werden. Im zweiten Versuchsabschnitt soll das Ruhe-EKG des Menschen mit dem einer Maus verglichen werden. Im letzten Versuchsabschnitt wird anhand eines ca. 20 minütigen Films die Herztätigkeit eines Frosches am frei präparierten Herzen dargestellt.

Grundkenntnisse

Anatomie:

Kreislaufsysteme bei Flußkrebs, Frosch und Säuger; Bau Krebs-, Frosch- und Säugerherz; vegetatives Nervensystem, Morphologie der Herzmuskelfasern

Erregungsentstehung und Weiterleitung:

Autorhythmische Zentren, Mechanismus der Erregungsbildung, Sinusknoten, Atrioventrikularknoten, erregungsleitende Strukturen, Form des Aktionspotentials der Zellen im Schrittmacher- und im Arbeitsmyokard, Refraktärperiode, elektromechanische Kopplung, Nicht-Tetanisierbarkeit des Herzens, EKG-Entstehung und EKG-Komponenten.

Mechanik und Modulation der Herzkontraktion:

Systole, Diastole, Schlagvolumen, Herzausstoß, Blutdruck, Puls, Normalwerte, Herzklappentätigkeit, Abhängigkeit der Herztätigkeit von der Sympathikus- und Vaguswirkung (Inotropie, Chronotropie, Dromotropie), Frank Starling Mechanismus

Literatur zur Vorbereitung:

- Heldmaier G, Neuweiler G: Vergleichende Tierphysiologie. Bd. 2 Vegetative Physiologie. Springer-Verlag
- Klinke, Silbernagel: Lehrbuch der Physiologie, Thieme-Verlag
- Schmidt RF, Thews G: Physiologie des Menschen. Springer-Verlag

Zur Vertiefung:

- Gauer/Kramer/Jung: Herz und Kreislauf, Urban & Schwarzenback.

1. Einfluss von körperlicher Aktivität auf Puls, Blutdruck und elektrische Aktivität des Herzens

Material und Methoden

a) Blutdruckmessung

Die Blutdruckmessung erfolgt indirekt, d.h. unblutig nach dem Verfahren von Riva-Rocci (RR): Dabei wird die linke Oberarmarterie (A. brachialis) durch eine um den Oberarm angelegte Luftmanschette zusammengedrückt, wenn der Kompressionsdruck der Manschette den im Gefäßinneren systolischen Blutdruck gerade übersteigt. Bei Verminderung der Kompression wird das kollabierte Gefäßrohr zunächst nur während der Druckspitzen wieder entfaltet. Das dabei auftretende pulssynchrone Fließgeräusch

kann man mit Hilfe eines Höhrrohrs (Stethoskop) distal der Kompressionsstelle (in der Ellenbeuge) hören, sobald der Manschettendruck den systolischen Druck unterschreitet. Bei weiterem Druckabfall nimmt es zunächst an Stärke zu, sobald der diastolische Druck unterschritten wird, verschwindet es wieder.

b) Puls

Der Puls reflektiert die sich durch den Körper ausbreitende Druckwelle, die bei der Kontraktion des Ventrikels (Systole) entsteht. Er ist immer dort besonders gut tastbar, wo dicht unter der Hautoberfläche ein arterielles Gefäß verläuft. Die Pulskontrolle erfolgt durch Auflegen von Zeige-, Mittel- und Ringfinger auf die A. radialis (Speichenschlagarterie) des linken Handgelenks. In der Regel wird die Pulsfrequenz innerhalb von 15 Sekunden bestimmt und dann auf die Minute hoch gerechnet. Bei gesunden Menschen beträgt der Ruhepuls in der Regel ca. 60-80 „Schläge“ pro Minute.

c) Ableitung des EKG beim Menschen

Mittels Elektrokardiographie werden Veränderungen der Potentialdifferenz (mV) zwischen zwei Punkten auf der Körperoberfläche registriert. Grundsätzlich läßt sich von jedem Punkt der Körperoberfläche ein EKG (Elektrokardiogramm) ableiten. Nach Übereinkunft wird das EKG jedoch von festgelegten Punkten abgenommen.

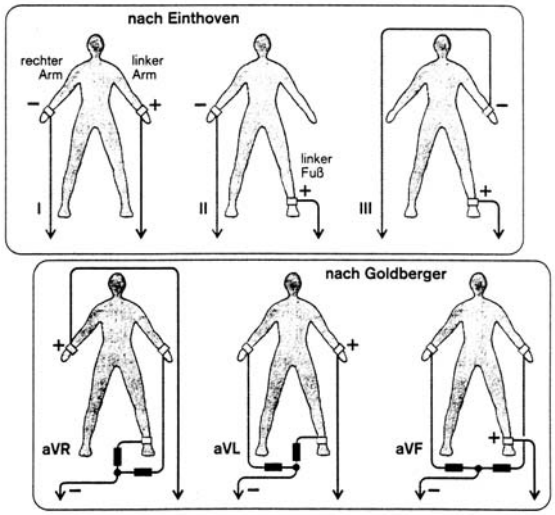
Je nach Ableitungsform erhält man verschiedene EKGs, die sich in Amplitude und Ausschlagsrichtung unterscheiden. Man unterscheidet: a) bipolare und b) unipolare Ableitungen (Abbildung 1).

Bei den bipolaren Extremitätenableitungen nach Einthoven (I, II, III) wirken die beiden Arme und das linke Bein wie verlängerte Elektroden. Ableitung I betrifft die Verbindung zwischen rechtem und linkem Arm. Ableitung II bezieht sich auf die Verbindung zwischen rechtem Arm und linkem Fuß, Ableitung III auf die Verbindung zwischen linkem Arm und linkem Fuß.

Auch die unipolaren Extremitätenableitungen nach Goldberger oder V-Ableitungen werden an beiden Armen und am linken Bein abgeleitet. Doch werden hierbei jeweils die Elektroden zweier Extremitäten über Widerstände zusammengeschaltet und dienen als Bezugselektrode (indifferente) gegenüber der dritten, differenten Elektrode. Die Goldberger Ableitungen sind nach der jeweils differenten Elektrode benannt:

aVR=rechter Arm, aVL=linker Arm und aVF=linker Fuß (aV= augmented Voltage, da es zu einer Vergrößerung der Ausschlaghöhe um bis zu 50% kommt.

Abbildung 1:



Quelle: Klinke und Silbernagl, Lehrbuch der Physiologie

Versuchsdurchführung:

Legen Sie vor Versuchsbeginn für jeden der aufgeführten Versuche die Anzahl der Versuchspersonen fest und fertigen Sie entsprechende Tabellen für Ihre anfallenden Meßwerte an.

I. Zunächst wird bei allen Teilnehmern Puls und Blutdruck in Ruhe (sitzend) gemessen.

II. Nacheinander sollen bei mindestens zwei Personen pro Gruppe die Veränderungen in Puls und Blutdruck bei körperlicher Belastung im Zeitverlauf untersucht werden. Hierzu steigt eine Versuchsperson auf das Fahrradergometer. Nach einer Anpassung von einigen Minuten auf dem Fahrradergometer sitzend wird der Ruhepuls und Ruhe-Blutdruck ermittelt (t_{-1}). Hierauf soll sich die Versuchsperson einer maximalen körperlichen Belastung von 1 Minute Dauer (Stoppuhr!) aussetzen. Unmittelbar nach Ablauf der Minute werden erneut Puls und Blutdruck bestimmt (t_0),

die Versuchsperson bleibt weiterhin auf dem Fahrradergometer sitzen, und die Puls- und Blutdruckmessung wird nach 3 (t_1)und 6 (t_2) Minuten wiederholt.

III. Erweiterung mit EKG

Eine Versuchsperson legt sich auf eine Liege und wird gemäß Anleitung an das EKG-Gerät angeschlossen. Nach einigen Minuten wird ein Ruhe-EKG registriert (t_{-1}). Die Versuchsperson setzt sich hierauf auf das Fahrradergometer. Nach einer kurzen Anpassung auf dem Fahrradergometer sitzend soll für 1 Minute eine maximale körperliche Belastung erreicht werden. Sofort nach Beendigung der Belastung steigt die Versuchsperson vom Fahrrad, legt sich auf die Liege und ein EKG wird aufgezeichnet (t_0). Die Versuchsperson bleibt am Gerät angeschlossen liegen und nach 3 (t_1) bzw. 6 (t_2) Minuten wird ein weiteres EKG registriert.

Auswertung:

1. Vergleichen Sie die gemessenen systolischen und diastolischen Ruhe-Blutdruckwerte sowie die Pulsfrequenzen mit den Literaturwerten.
2. Stellen Sie den Verlauf von Puls und Blutdruckwerten (systolisch und diastolisch) vor und nach Belastung graphisch dar. Wie verändern sich die Werte?
3. Ermitteln Sie aus dem EKG die Herzfrequenzen vor und nach Belastung und stellen Sie den Verlauf dar.
4. EKG: Stellen Sie graphisch die Dauer von PQ-Intervall, QT-Intervall, TP-Intervall und RR-Intervall dar. Wie verändern sich diese Parameter unter Belastung?
5. Wie unterscheiden sich die verschiedenen Ableitformen und wie erklärt sich dies?

Diskutieren Sie alle aufgetretenen Veränderungen zwischen Ruhe- und Belastung (Puls, Blutdruck, EKG) vor dem Hintergrund der Ihnen bekannten Sympathikus- und Parasympathikus-Wirkung auf das Herz und ihrer Folgen für die Herztätigkeit.
Bitte fügen Sie Ihre Originaldaten dem Protokoll als Anhang bei und kleben Sie die EKG-Registrierungen ein.

2. Ableitung des EKG bei der Maus

An einer narkotisierten Maus (*Mus musculus*) kann das EKG an den Extremitäten in ähnlicher Weise wie beim Menschen abgeleitet werden.

Material und Methoden:

Das Versuchstier wird von dem/der Betreuer(in) mit einer Kombination aus intramuskulär injiziertem Ketaminhydrochlorid (100mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (2mg/kg Körpergewicht) betäubt. Nach Einsetzen der Narkose werden die Elektroden angebracht. Die Registrierung erfolgt via PC.

Durchführung:

Sobald das Tier ruhig liegt, und keine Störpotentiale das EKG überlagern, registrieren Sie auf dem Speicherschirm 2 - 3 Zyklen eines möglichst störungsfreien EKG und anschließend das EKG eines größeren Zeitbereichs.

Auswertung:

1. Mit welcher Ableitungsform wurde das EKG der Maus registriert?
2. Bestimmen Sie die Herzfrequenz der Maus, in dem Sie eine mittlere Schlagrate (bei einem großem Zeitfenster) berechnen.
3. Ermitteln Sie die Dauer von PQ-Intervall, QT-Intervall, TP-Intervall und RR-Intervall.

Diskutieren sie die beobachteten Unterschiede in der Herztätigkeit zwischen Mensch und Maus!

3. Physiologische Untersuchungen am Froschherzen (Videofilm)

In diesem Versuchsteil wird die Herztätigkeit eines afrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus leavis*) unmittelbar am frei präparierten Herzen sichtbar gemacht und manipuliert. Sie erhalten Registrierungen für Ihr Protokoll (Mechanogramme). Werten Sie diese aus und diskutieren Sie daran die in diesem Versuchsabschnitt angesprochenen Fragen.

I) Beobachtung der Herzbewegungen

Methode, Durchführung und Auswertung:

Das Froschherz wird freipräpariert. Verfolgen Sie die Präparationsschritte. Beobachten Sie den Kontraktionsverlauf. Beachten Sie die wichtigsten Herzabschnitte: Sinus venosus, Vorkammern, Ventrikel, Truncus arteriosus, Aortenbogen.

1. Beobachten Sie die Kontraktionsfolgen der einzelnen Herzabschnitte. Wo beginnt die Kontraktionswelle und wo endet sie?
2. Warum erfolgt die Präparation des Tieres in Ringer-Lösung?

II) Registrierung des Mechanogramms bei verschiedenen Temperaturen

Methode:

Die Herzspitze wird an einer Herzklammer festgeklemmt und am Drehwinkelaufnehmer befestigt. Die Herzkontraktionen werden von einem Y-T-Schreiber aufgezeichnet (Abbildung 2). Die Registriergeschwindigkeit beträgt in allen Versuchen 12 cm/min.

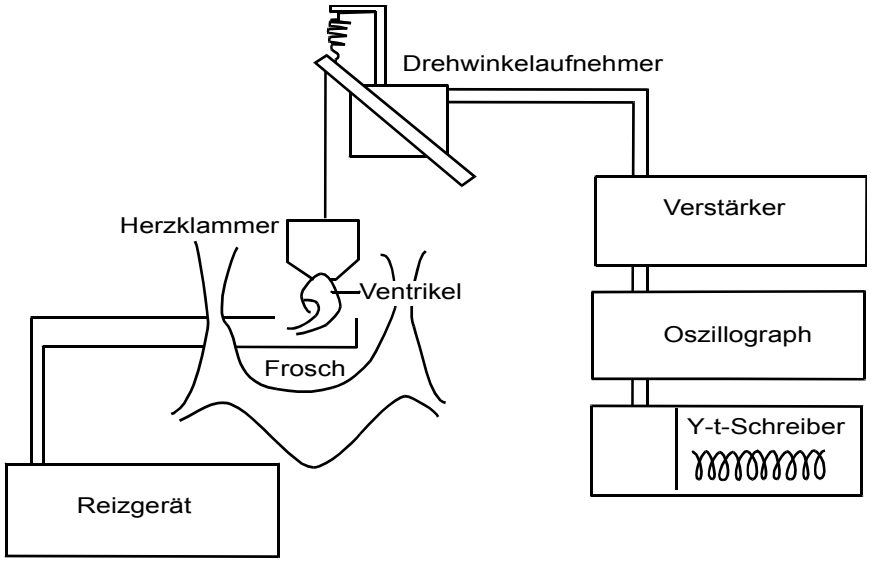


Abbildung 2: Versuchsaufbau

Durchführung und Auswertung:

Das Herz wird mit Froschringerlösungen unterschiedlicher Temperaturen beträufelt.

1. Berechnen Sie aus dem Mechanogramm (Teil I, http://online-media.uni-marburg.de/biologie/tierphysiologie/) die Herztätigkeit (Anzahl der Herzschläge/min) bei verschiedenen Temperaturen.
2. Wie verändert sich die Kontraktionsamplitude (%) bei Wärme und Kälte im Vergleich zu Raumtemperatur (20°C)?
3. Diskutieren Sie die Ergebnisse: Warum ist die Herztätigkeit temperaturabhängig?

III) Einfluß von Adrenalin und Acetylcholin auf die Herztätigkeit

Bei Wirbeltieren wirken die postganglionären Transmitter des Sympathikus - Adrenalin und Noradrenalin - und der Transmitter des Parasympathikus (Nervus vagus), Acetylcholin, auf die autorhythmischen Zentren des Herzens. Im folgenden Versuchsabschnitt soll die Wirkungsweise dieser Pharmaka auf die Herztätigkeit untersucht werden.

Methoden:

Auf das bei Raumtemperatur schlagende Herz wird zuerst Acetylcholinlösung, dann Atropinlösung und zuletzt Adrenalinlösung appliziert (Zimmertemperatur, 20°C). Zwischen den Applikationen der jeweiligen Lösungen wird das Herz mit Ringer gespült.

Auswertung:

Sie erhalten typische Abschnitte des Mechanogramms (Teil II, http://online-media.uni-marburg.de/biologie/tierphysiologie/).

1. Berechnen Sie daran die Herztätigkeit (Herzschlagrate und Amplitude) und diskutieren Sie die Adrenalin-, Acetylcholin- und Atropinwirkung. Vergleichen Sie diese Werte mit denen der normalen Herztätigkeit bei Raumtemperatur (20°C).

IV) Elektrische Reizung des Froschherzens

Im Gegensatz zu Skelettmuskelfasern sind die Herzmuskelfasern nicht tetanisierbar, da sie durch ihre lange Refraktärzeit vor einer schnellen Wiedererregung geschützt sind. Trotzdem lassen sich während der Refraktärzeit durch elektrische Reize zum geeigneten Zeitpunkt Kontraktionen auslösen. Dieses Phänomen wird im folgenden Versuch untersucht.

Methode:

Das Herz wird über herznah angebrachte Elektroden elektrisch gereizt. Die Reizamplitude beträgt 5 mV; die Reizdauer beträgt 5 ms (Raumtemperatur 20°C).

Auswertung:

1. Versuchen Sie die Wirkung der Reize zu erklären und auf dem Mechanogramm (Teil III; http://online-media.uni-marburg.de/biologie/tierphysiologie/) auszuwerten. Bestimmen Sie Herzschlagraten der Mechanogramme bei Dauerreizung mit Rechteckreizen von 5 ms Dauer und Frequenzen von 1, 10 und 50 Hz und vergleichen Sie die Werte miteinander.

V) Registrierung des EKG des Froschherzens

Methode:

Über am Froschherz befestigte Elektroden werden die Spannungsänderungen mittels eines Oszillographen sichtbar gemacht.

Auswertung:

1. Zeichnen Sie das EKG des Frosches, beschriften Sie die einzelnen Kurvenabschnitte und ordnen Sie diese den erregungsleitenden Strukturen zu.
2. Vergleichen Sie das EKG von Frosch und Säuger und diskutieren Sie die Unterschiede.

KURS D: HORMONPHYSIOLOGIE

WIRKUNG VON ADIPOKINETISCHEM HORMON AUF DEN LIPIDGEHALT DER HÄMOLYMPHE

1. EINLEITUNG

Das adipokinetische Hormon (AKH) der Insekten spielt eine zentrale Rolle bei der Mobilisierung von Lipiden, die als Energielieferant für die Flugmuskulatur benötigt werden (**Abb. 1**). Ziel des Experimentes ist der Nachweis einer adipokinetischen Wirkung von AKH bei der afrikanischen Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria*. Hierzu wird adulten, flugfähigen Tieren das Hormon injiziert und der Lipidgehalt der Hämolymphe vor und nach der Injektion verglichen (Biotest). Lipide werden durch konzentrierte Schwefelsäure zu Produkten umgesetzt, die mit Vanillin-Reagenz zu einer gefärbten Substanz reagieren, deren Absorption bei 540 nm gemessen werden kann. Diese Reaktion macht eine quantitative colorimetrische Bestimmung von Lipiden möglich. Mit Diglyceridlösungen bzw. Diacylglycerol bekannter Konzentration wird eine Standardkurve erstellt, aus der dann die Konzentration der zu bestimmenden Probe berechnet werden kann.

Neben dieser quantitativen Untersuchung wollen wir auch in einem qualitativen Assay mittels Dünnschichtchromatografie (DC) von Haemolymphproben vor und nach der AKH-Injektion feststellen, welche Klasse von Lipiden besonders auf die Hormonzugabe anspricht.

Mitzubringen sind: Laborkittel, geschlossene Schuhe, Schreibzeug, Taschenrechner

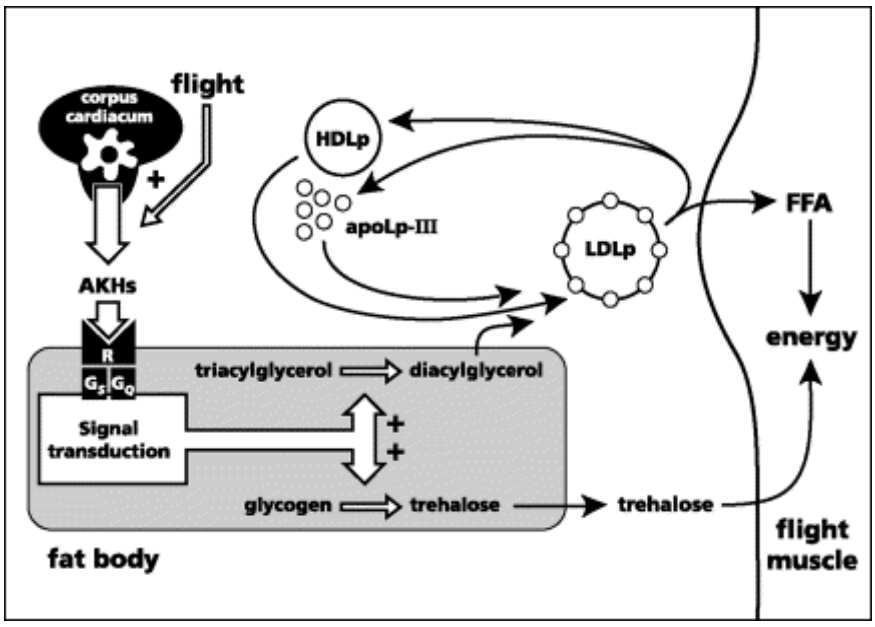


Abb. 1: Schematic overview of AKH-controlled substrate mobilization from locust fat body during flight activity. AKHs: adipokinetic hormones;
Abkürzungen:
R: receptor;
G: G protein
HDLp: high-density lipophorin
LDLp: low-density lipophorin;
apoLp-III: apolipophorin III;
FFA: free fatty acids.

(aus: Van der Horst et al. 2003)

Grundkenntnisse

- Lipidstoffwechsel von Insekten/Vertebraten
- Endokrine Drüsen von Insekten/Vertebraten
- Hormonklassen
- G-Protein-gekoppelte Hormonrezeptoren, cAMP
- Adipokinetisches Hormon: Lokalisation, Struktur und Wirkung
- Diacylglycerol
- Prinzip der Dünnschichtchromatographie
- Microsoft Excel

Literatur zur Vorbereitung (Hormonphysiologie)

- Heldmaier & Neuweiler, Vergleichende Tierphysiologie, Band 2: Vegetative Physiologie, Springer Verlag. Kapitel 9: Chemische Kommunikation durch Hormone.

Weiterführende Literatur (AKH)

- Stone, J. V. and Mordue, W. (1980): Adipokinetic Hormone. In: Neurohormonal Techniques in Insects (Chapter 2). Springer Verlag. (Bibliothek Biologie, Signatur B 640:27).
- Van der Horst, D. J. (2003): Insect adipokinetic hormones: release and integration of flight energy metabolism. Comp. Biochem. Physiol B 136:217-226 (Link zum PDF im Downloadbereich unter: http://online-media.uni-marburg.de/biologie/tierphysiologie/Hormone/hormone.html)

Im Versuch verwendete Puffer und Reagenzien

Ringer-Lösung (Schistocerca gregaria) pH 6.8

- NaCl (140mM)
- KCl (10 mM)
- $NaH_2PO_4 \bullet H_2O$ (4 mM)
- $Na_2HPO_4 \bullet 2\ H_2O$ (6 mM)
- $CaCl_2$ (2mM)

Vanillin-Reagenz:

- Vanillin (13.8 mM)
- H_3PO_4 (51%)

Diacylglycerol (1 mg/ml) = Diolein = Dioleoylglycerol ($C_{39}H_{72}O_5$)
Adipokinetisches Hormon II (25 µM): PGlu–Leu–Asn–Phe–Ser–Thr– Gly- Trp-NH_2

2. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

2.1 Vorbereitungen

Es werden pro Gruppe 4 Tiere verwendet, die mindestens 30 Minuten vor dem Experiment nicht mehr geflogen sind. Die Tiere sitzen hierzu unter umgedrehten Trichtern.

- Beschriften Sie insgesamt 9 Reaktionsgefäße: 1 **V** – 4 **V** = Proben der Tiere **V**or der Injektion; 1 **N** – 4 **N** = Proben **N**ach der Injektion, B0 = Nullwert mit Ringerlösung.
- Auf den Boden jedes Gefäßes werden 50 µl konz. Schwefelsäure pipettiert (Schutzbrille tragen und unter dem Abzug arbeiten!).

Achtung, konz. Schwefelsäure ist stark ätzend!

- Die Kieselgelplatte für die Dünnschichtchromatographie (DC) wird bereit gelegt. Der Auftragbereich der Proben (2 cm vom unteren Rand) wird mit einem Bleistift markiert. Insgesamt sollen im Laufe des Experiments 10 Proben (Tiere 1-4 vor und nach der Injektion, ein Diacylglyceridstandard (Diolein) sowie ein Gemisch aus Mono- Di- und Triglyceriden; siehe Punkt 3.1) nach und nach in gleichmäßigem Abstand voneinander aufgetragen werden. Tragen Sie die Hämolympheproben so auf, <u>dass die Proben jedes Tieres vor und nach der Injektion direkt nebeneinander</u> zu liegen kommen. Notieren Sie sich die Reihenfolge.

2.2 Tierexperimentelles Vorgehen (I)

- Die Versuchstiere werden an den Flügeln gehalten, auf den Rücken gedreht und an der Basis (Coxa) eines Hinterbeines mit einer Kanüle so angestochen, dass mit einer Mikroliterpipette 2 x 1 µl Hämolymphe entnommen werden kann.
- 1 µl Hämolymphe wird in die vorbereiteten Reaktionsgefäße mit Schwefelsäure überführt (In die Schwefelsäure pipettieren, nicht an den Rand des Gefäßes!).
- Weitere 1 µl der Hämolymphe jedes Tieres wird auf die DC-Platte aufgetragen.
- 10 µl Ringer-Lösung bzw. AKH 25 µM werden den Versuchstieren mit einer Hamiltonspritze durch die Membran zwischen dem 2. und 3. Abdominalsternit injiziert.
  Tier 1 + 2: je 10 µl Ringerlösung
  Tier 3 + 4: je 10 µl AKH (25 µM)
- Das Reaktionsgefäß für den Nullwert (B0) wird mit 1 µl Ringerlösung beschickt.
- Die Tiere werden für <u>genau</u> 60 min zurück unter die Trichter gesetzt.
- In der Zwischenzeit werden die Diacylglycerolstandards für die quantitative Bestimmung angesetzt (siehe Punkt 2.3).

2.3 Erstellen einer Standardkurve für Diacylglycerol

Es soll ausgehend von einer Stammlösung (1 mg Diacylglycerol (= Diolein) / ml Chloroform) eine Standardkurve für Diacylglycerol im Bereich von 0-150 µg hergestellt werden. Jeder **S**tandard wird doppelt angesetzt (**S**1/**S**1'-**S**7/**S**7'; siehe Pipettierschema). Das Endvolumen jeder Probe soll 200 µl betragen. Wieviel µl Stammlösung bzw. Chloroform muss in jedes Reaktionsgefäß pipettiert werden? Vervollständigen Sie die Tabelle!

Achtung: Chloroform ist giftig und fruchtschädigend!
Nur unter dem Abzug arbeiten!

Ansatz	Diacyglgycerol (µg)	Diacylglycerol (µl)	Chloroform (µl)	Endvolumen (µl)
S1/S1'	0			200
S2/S2'	25			200
S3/S3'	50			200
S4/S4'	75			200
S5/S5'	100			200
S6/S6'	125			200
S7/S7'	150			200

- Stellen Sie die Standards gemäß Pipettierschema her.
- Lassen Sie das Chloroform bei 80°C auf dem Heizblock für ca. 10-15 min abdampfen (Abzug!).
- Die Proben werden kurz im Wasserbad abgekühlt.
- Hierauf wird in jedes Cup 50 µl Schwefelsäure pipettiert (Abzug!).
- Abschließend werden 1µl Ringer-Lösung hinzugefügt.
- Die Standardproben sind jetzt fertig für die Lipidbestimmung (Abschnitt 2.5).

2.4 Tierexperimentelles Vorgehen (II)

- Genau 60 min. nach der Injektion wird den Tieren erneut 1 µl Hämolymphe entnommen und in die vorbereiteten Reaktionsgefäße mit der Schwefelsäure gegeben (s.o.)
- Zusätzlich wird je 1 µl Hämolymphe der Tiere auf die DC-Platte aufgetragen.

2.5 Colorimetrische Bestimmung des Lipidgehalts

Es ist essentiell, dass alle Proben mit Hilfe des Vortexgerätes gut gemischt werden. Nach dem Mischen müssen die Proben kurz abzentrifugiert werden, damit alle Flüssigkeit sich am Boden des Gefäßes befindet!

- Die gut gemischten Proben (Standards und Hämolymphproben) werden für 10 min. auf dem Heizblockthermostat bei 80°C erhitzt und dann im Wasserbad abgekühlt.
- In jedes Cup wird 1 ml Vanillinreageagenz pipettiert. Vanillinreagenz reagiert auf Zugabe von Lipiden mit einem Farbumschlag (colorimetrischer Nachweis).

Achtung, Das Vanillingreagenz ist lichtempfindlich und enthält konz. Phosphorsäure!

- Proben gut mischen (durch Auf- und Abpipettieren) und 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
- Die Extinktion der Proben wird im Photometer bei 540 nm gemessen. Als Referenz dient die Nullprobe (B0). Für die Messung geben Sie 1 ml jeder Probe in eine Küvette und notieren die Extinktion in einer Ergebnistabelle. Erstellen Sie nachfolgend mit Hilfe von *Microsoft Excel* (PC-Pool) eine Graphik der Standardkurve und berechnen Sie hieraus den Lipidgehalt der Proben.

3. Dünnschichtchromatographie (DC) der Lipide aus der Hämolymphe

Da das Vanillin-Reagenz mit einer Vielzahl von Lipiden reagiert, kann beim colorimetrischen Nachweis lediglich der Gesamtlipidgehalt bestimmt werden. Eine Aussage über die einzelnen Lipidklassen kann mit dieser Methode nicht getroffen werden. Die DC bietet durch die Auftrennung der verschiedenen Lipidklassen dagegen die Möglichkeit, die in die Hämolymphe freigesetzten Lipide qualitativ zu untersuchen.

In diesem Praktikumsteil wird die sogenannte HPTLC (*high performance thin layer chromatography* = HPDC) angewendet. Sie weist gegenüber der Standard-DC eine schnellere und schärfere Trennung sowie eine größere Empfindlichkeit auf. Erreicht wird dies durch kleinere und wesentlich besser größennormierte Kieselgelpartikel. Die Proben werden auf eine Konzentrierungszone aufgetragen, an der die Lipide nicht adsorbiert werden. An der Grenze zur eigentlichen Trennzone werden die Proben zu einer Linie konzentriert, die Trennung dadurch wesentlich verbessert.

3.1 Vorgehensweise

- Aufgetragen auf die DC-Platte wurden ja bereits die Haemolymphproben der Tiere vor und nach der Injektion
- Tragen Sie zusätzlich als Referenzsubstanzen 1 µl eines Diacylglyceridstandards (Diolein; 50 mg/ml) sowie 1 µl eines Gemisches aus Mono- Di- und Triglyceriden = handelsübliches Sonnenblumenöl (1:20 verdünnt) auf.
- Nachdem die Proben getrocknet sind; wird die DC-Platte in eine Kammer mit Chloroform-Methanol-Essigsäure 98:2:1 als Laufmittel eingestellt und so lange chromatografiert, bis die Lauffront etwa ein Drittel der Platte heraufgewandert ist.
- Die Platte wird gut getrocknet, im Abzug mit 10% $CuSO_4$ in 8% H_3PO_4 besprüht und anschließend 10 min. im Wärmeschrank auf 160°C erhitzt.
- Die entstandenen Flecken werden vorsichtig mit einem Bleistift markiert und mit den Referenzsubstanzen verglichen. Achten Sie vor allem auf die Größe des „Diacylglycerol-Spots“. Was sagt die Größe über die Konzentration aus? Wie verhält sich die Konzentration nach Injektion von AKH?
- Das Chromatogramm ist lichtempfindlich und verblasst. Es sollte deshalb für das Protokoll kopiert oder eingescannt werden.

KURS E: EXKRETION

NIERENFUNKTIONSPRÜFUNG

1. Einleitung

Die beiden wichtigsten Aufgaben der Niere sind

- die Ausscheidung von Stoffwechselendprodukten (harnpflichtige Substanzen wie Harnstoff, Harnsäure) und Fremdstoffen (Medikamente), aber auch die Konservierung wertvoller Blutbestandteile (z. B. Glucose, Aminosäuren).
- die Regulation des Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Base-Haushalts durch differenzierte Ausscheidung von Ionen und Wasser.

Um die letztere Funktion zu erfüllen, besitzt die Niere die Fähigkeit, auch gegen ein osmotisches Gefälle einen hoch konzentrierten oder stark verdünnten Harn zu bilden. Diese Funktion kann bei bestimmten Krankheiten oder durch Unfallverletzungen aufgehoben oder eingeschränkt sein. Fallen dabei größere Bezirke der Niere aus, so kann ein Mensch nicht mehr genügend Harn bilden. Der Wasserhaushalt des Körpers wird gestört, es kommt zur Ausbildung von Ödemen. Die Konzentration der harnpflichtigen Stoffwechselendprodukte im Blut steigt an, und der Patient kann an einer Urämie sterben. Bei einer klinischen Überprüfung der Nierenfunktion kann festgestellt werden, wieweit ein Patient seinen Harn verdünnen bzw. konzentrieren kann:
Der Patient trinkt 1 l Wasser innerhalb von 10 Minuten. Danach wird alle 30 Minuten die Blase entleert und es werden Menge und Osmolarität des Harns bestimmt. Die ausgeschiedene Harnmenge soll dabei nach 1 bis 2 Stunden größer als 300 ml pro 30 Minuten sein. Nach spätestens vier Stunden soll die gesamte überschüssige Flüssigkeit wieder ausgeschieden sein. Der osmotische Wert des Harns sinkt dabei von etwa 1000 mosm/l auf unter 100 mosm/l. Die Niere ist somit in der Lage, dem Körper fast reines Wasser zu entziehen.
Anschließend an den Verdünnungsversuch bekommt der Patient nur Trockenkost, aber keinerlei Flüssigkeit. Die bis zum nächsten Morgen ausgeschiedene Harnmenge wird gemessen und die Osmolarität bestimmt. Eine gesunde Niere scheidet dabei einen Harn mit einer Osmolarität von etwa 1000 mosm/l aus. Die Niere kann also bei Wassermangel

einen konzentrierten Harn bilden und mit wenig Flüssigkeit relativ viele Substanzen aus dem Körper entfernen.

2. Vorbereitung des Kurses

2.1 Grundkenntnisse

- Exkretionsorgane und -produkte bei verschiedenen Tiergruppen
- Nierenanatomie
- Glomeruläre Filtration
- Tubuläre Sekretion und Reabsorption
- Harnkonzentrierungsmechanismen / Henlesche Schleife
- Osmolarität / Osmolalität
- ADH (Adiuretin)
- Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

2.2 Literatur zur Vorbereitung

- Eckert R: Tierphysiologie, Thieme-Verlag
- Emmerich H: Stoffwechselphysiologisches Praktikum (Kapitel "Wasser- und Ionenhaushalt"). Thieme-Verlag
- Heldmaier G, Neuweiler G: Vergleichende Tierphysiologie. Bd. 2 Vegetative Physiologie. Springer-Verlag
- Schmidt RF, Thews G: Physiologie des Menschen, Springer-Verlag
  Schmidt-Nielsen K: Animal Physiology, Cambridge University-Press

bei weiterem Interesse:

- Beeukes III R: Renal countercurrent mechanisms, or how to get something for (almost) nothing. In: Taylor CR, Johansen K, Bolis L: A companion to animal physiology, S. 266-288. Cambridge University Press, 1982
- Cantin M, Genest J: Das Herz als endokrine Drüse. Spektrum der Wissenschaft 4/86: 122 (Scientific American 2/86: 62)

3. Versuch

Da im Kurs aus Zeitmangel keine vollständige Nierenfunktionsprüfung durchgeführt werden kann, wird nur der Einfluß eines Wasserstoßes (Tee) und zum Vergleich der

Einfluß von isotoner Flüssigkeitszufuhr (Gemüse-, Fleischbrühe) auf die Harnausscheidung (Menge, Osmolarität) und die Blutosmolarität untersucht.

3.1 Versuchsdurchführung

1. Die Versuchspersonen entleeren ihre Blase. Die Menge des Harns wird gemessen und die osmotische Konzentration mit einem Gefrierpunkt-Osmometer bestimmt. Gleichzeitig wird den Versuchspersonen an der Fingerbeere Blut abgenommen und ebenfalls die Osmolarität bestimmt. Zur Blutabnahme Fingerbeere (oder Ohrläppchen) mit Alkohol reinigen und mit einer sterilen Einweg-Hämostilette ca. 2 mm tief einstechen. Ersten Blutstropfen verwerfen.

2. Sofort anschließend trinken die Versuchspersonen innerhalb von 10 Minuten entweder 1 l dünnen Pfefferminztee oder 1 l Brühe und lassen dann alle 30 Minuten Wasser. Die Harnmenge und die Osmolarität der Harnproben werden bestimmt. Bei Interesse kann der Versuch erweitert werden, indem z.B. der Einfluß von starkem Flüssigkeitsverlust (Schwitzen nach intensivem Sport, z.B. Joggen), oder von Koffein, Nikotin oder Alkohol auf die Nierentätigkeit untersucht wird.

3. Die Osmolarität des Blutes wird 30 Minuten und nochmals 120 Minuten nach der Wasseraufnahme erneut bestimmt.

4. Es wird notiert, was die Versuchspersonen in den letzten Stunden vor dem Versuch zu sich genommen haben.

3.2 Bestimmung der Osmolarität von Harn- und Blutproben

3.2.1 Messprinzip

Konzentrationsänderungen osmotisch wirksamer Teilchen werden von Veränderungen des Gefrierpunktes, des Siedepunktes und des Dampfdruckes begleitet. Messungen dieser Parameter ergeben daher Aufschluß über die Osmolarität einer Lösung (z. B. in Harn, Blut). So ist der Gefrierpunkt einer Lösung um so niedriger, je höher deren Osmolarität ist. Im Kurs wird das Kryoskop OSMOMAT030 eingesetzt, mit dem die Gefrierpunkterniedrigung einer Lösung bestimmt wird. Während Wasser einen Gefrierpunkt von 0°C besitzt, zeigt eine Lösung mit einer Salzkonzentration von 1 osmol/kg einen Gefrierpunkt von -1,858°C (kryoskopische Konstante). Bei dissoziierenden Stoffen erhöhen sich der osmotische Druck und die Gefrierpunkterniedrigung entsprechend der Teilchenzahl, in die das Molekül bei der Dissoziation zerfällt. Die osmotisch wirksame Konzentration einer Lösung wird in der Biologie nicht durch den osmotischen Druck in atm, sondern durch die Osmolarität zum Ausdruck gebracht. Die Einheit der Osmolarität ist osmol/l. Die formale Beziehung zwischen Gefrierpunkterniedrigung (dT) und Osmolarität ist:

$$\text{Osmolarität (osmol/l)} = \frac{dt(°C)}{1{,}858}$$

Eine Lösung mit einer Gefrierpunkterniedrigung von 1,86°C hat demnach eine Osmolarität von 1 osmol.

3.2.2 Der OSMOMAT 030

Die Probelösung wird mit einem Peltier-Kühlsystem abgekühlt, wobei die Temperatur elektronisch überwacht wird. Hat die Probelösung eine bestimmte Temperatur unterhalb des Gefrierpunktes erreicht, so wird automatisch die Kristallisation eingeleitet.

Dies geschieht durch Impfen der Lösung mit Eiskristallen. (Eine Edelstahlnadel wird an einem zweiten Kühlsystem soweit abgekühlt, dass an ihrer Spitze in Folge kondensierter Luftfeuchtigkeit winzige Eiskristalle haften. Diese Nadel taucht kurzzeitig in die unterkühlte Probelösung ein.) Danach steigt die Temperatur spontan bis auf die Kristallisationstemperatur an; diese Temperatur wird mit einer Auflösung von 1,858 * 10-3 °C gemessen.

Die sich einstellende Gefrierpunktstemperatur wird vom Gerät erfaßt und unter Berücksichtigung der Kalibrierwerte in Osmolalitätswerte umgerechnet und an der Digitalanzeige angezeigt.

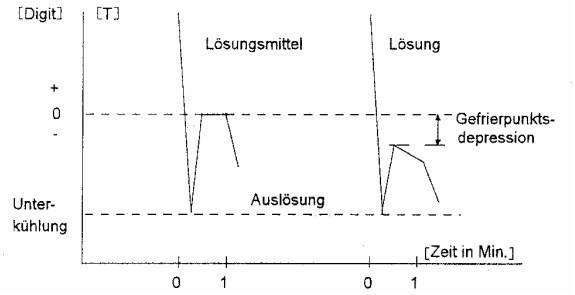


Abb.1: Bestimmung der Gefrierpunktserniedrigung

3.2.3 Kalibrierung des OSMOMAT 030

Vor der Messung der Gesamtosmolalität von Probelösungen muß der OSMOMAT 030 mit Wasser und einer Kalibrierlösung kalibriert werden.

Kalibrieren des Null-Punktes mit Wasser

Zunächst wird ein sauberes und trockenes Meßgefäß mit einer Pipette mit 50 µl Wasser gefüllt. Dabei dürfen keine Luftbläschen in der Flüssigkeit sichtbar sein!
Das Meßgefäß wird dann bis zum Anschlag auf den Meßgefäßhalter gesteckt so dass der Temperaturfühler von dem Wasser umgeben ist.
Vor dem Absenken des Meßgefäßhalters wird die Taste "ZERO" gedrückt.
Nach erfolgter Unterkühlung und Auslösung der Kristallisation stellt sich der Gefrierpunkt von Wasser ein, der vom Gerät erfaßt wird. Der Meßwert wird automatisch vom Gerät als "Nullwert" übernommen, und der Wert "0" wird an der Digitalanzeige sichtbar.
Beim Kalibrieren ist zu beachten, dass möglicherweise der Temperaturfühler von vorhergegangenen Messungen noch mit Proberesten kontaminiert ist. Eine Kontrollmessung mit Wasser sollte nach der Null-Punkt-Kalibration die exakte Kalibration bestätigen. Gegebenenfalls muß eine erneute Kalibrierung erfolgen.

Für jede neue Messung muß ein sauberes und trockenes Meßgefäß mit frischem Wasser benutzt werden!

Eichen mit einer Kalibrierlösung

Zunächst wird ein sauberes und trockenes Meßgefäß mit einer Pipette mit 50 µl einer Kalibrierlösung gefüllt.

Das Meßgefäß wird dann bis zum Anschlag auf den Meßgefäßhalter gesteckt. Der Temperaturfühler ist von der Flüssigkeit umgeben. Vor dem Absenken des Meßgefäßhalters wird die Taste "CAL" gedrückt, worauf an der Digitalanzeige der Wert "300" angezeigt wird. Beim weiteren Drücken dieser Taste können nacheinander folgende Werte eingestellt werden: 400, 500, 600, 700, 750, 1200, 1800, 2500, 300, 200 und wieder 300.

Nach Absenken des Meßgefäßhalters wird die Lösung unterkühlt und die Kristallisation ausgelöst. Es stellt sich ein Meßwert ein, der als Kalibrierwert entsprechend der vorhergegangenen Einstellung automatisch übernommen und an der Digitalanzeige angezeigt wird.

Dieser Eichwert wird durch eine Kontrollmessung mit einer neuen Kalibrierlösung bestätigt. Gegebenenfalls muß eine erneute Kalibrierung erfolgen.

3.2.4 Messen einer Probelösung

Nach Eichung und Überprüfung der Eichung können können die Urin- und Blutproben gemessen werden.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit werden ***Doppelbestimmungen*** durchgeführt. Dazu müssen jeweils zwei saubere und trockene Meßgefäße mit derselben Probelösung gefüllt werden. Eine Meßwiederholung einer Probe ist nicht möglich, da sich die Probe während der Messung entmischt.

Da die Messungen unter den gleichen Bedingungen wie die Kalibration erfolgen müssen, werden entsprechend 50 µl der Probeflüssigkeit in ein trockenes und sauberes Meßgefäß mit einer Pipette eingefüllt.

Dabei müssen unbedingt Luftbläschen vermieden werden!

Das mit der Probeflüssigkeit gefüllte Meßgefäß wird bis zum Anschlag auf den Meßgefäßhalter gesteckt.

Vor Absenken des Meßgefäßhalters wird gegebenenfalls die Taste "SAMPLE" gedrückt. Die Kristallisation wird nach dem Unterkühlen der Probeflüssigkeit automatisch eingeleitet .

Der Osmolalitätswert wird an der Digitalanzeige angezeigt.

Nach jeder Messung muss der Temperaturfühler durch Abwischen mit einem weichen Papiertuch gründlich gereinigt werden, gegebenenfalls kann der Fühler auch mit einem mit Wasser angefeuchteten Tuch vorgereinigt werden.

Tritt keine Kristallisation oder eine spontane Kristallisation ein, befolgen Sie die Anweisung aus der Betriebsanleitung oder wenden Sie sich an Ihren Kursbetreuer.

4. Versuchsauswertung

- Stellen Sie die Versuchsergebnisse graphisch dar (y-Achse: Harnmenge, Osmolarität des Harns und der Blutproben; x-Achse: Zeit)!
- Interpretieren sie die Unterschiede zwischen den Versuchspersonen.
- Wie beeinflußt die unterschiedliche Osmolarität der Getränke die Harnmenge, Harn- und Blutosmolarität.

Welche Mechanismen der Regulation der Harnausscheidung sind dabei beteiligt?

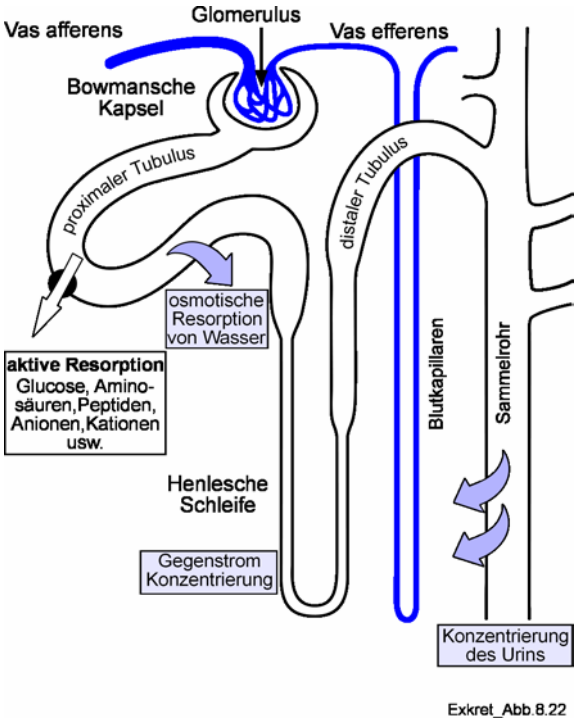


Abb. 8.22. Schematischer Aufbau und Funktion eines Säugetiernephrons. Aus den Glomerulus-Kapillaren wird durch Druckfiltration der Primärharn aus dem Blut gewonnen. Im proximalen Tubulus obligate Resorption aller nicht harnpflichtigen Substanzen durch aktiven Transport. Wasser folgt osmotisch nach. Zur Spitze der Henleschen Schleife wird der Urin im Gegenstrom konzentriert. Im distalen Tubulus aktive Resorption von Lösungsbestandteilen aus dem Urin. Wasser folgt wiederum passiv nach. Im Sammelrohr Konzentrierung des Urins durch osmotischen Wasserentzug

Abbildung aus G. Heldmaier: Vegetative Physiologie, Springer-Verlag

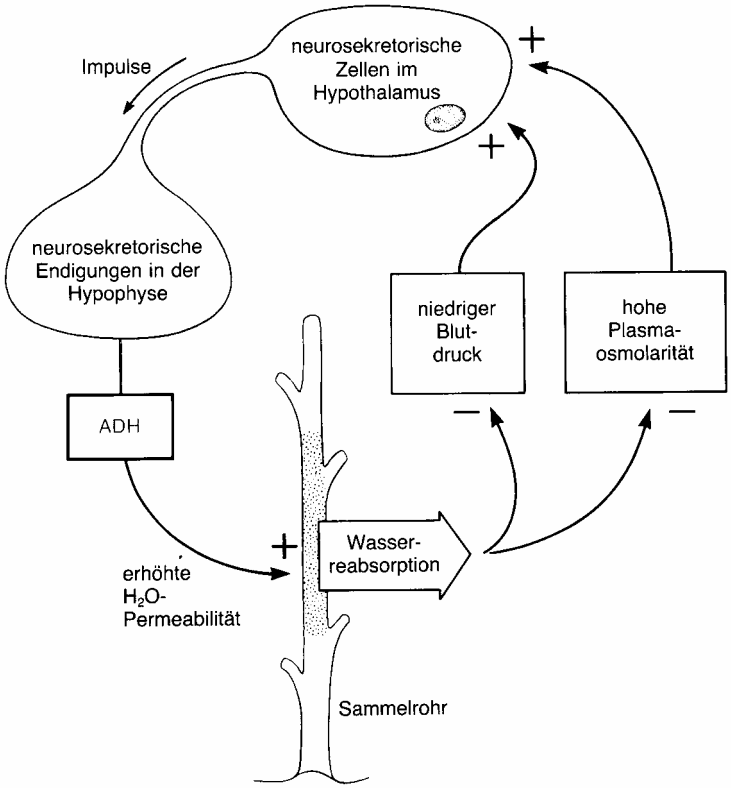


Abb. 12.**33** Feedback-Regulation der Blutosmolarität durch die Wirkung des antidiuretischen Hormons auf das Sammelrohr. ADH erhöht die Wasserpermeabilität der gepunkteten Region. Wasser wird daraufhin vermehrt dem Harn osmotisch entzogen. Aufgrund der vermehrten Wasserreabsorption werden die Bedingungen, die die ADH-Sekretion verursachen, gemildert.

Abbildung aus R. Eckert: Tierphysiologie, Thieme Verlag

KURSTEIL F: NERVENPHYSIOLOGIE (ABLEITUNGEN VOM BAUCHMARK DES REGENWURMS)

1 Einleitung

Im Gegensatz zu vielen anderen Körperzellen sind Nervenzellen (=Neurone) elektrisch erregbar, d.h. sie antworten bei Depolarisation des Membranpotentials nach Überschreiten der Feuerschwelle mit Aktionspotentialen (AP; Mehrzahl APs), die im Axon fortgeleitet werden. Solche auslösenden Depolarisationen werden in der biologischen Situation bei Nervenzellen durch postsynaptische Potentiale im Synapsenbereich und bei Rezeptoren durch physikalische oder chemische Reizung erzeugt. Im physiologischen Experiment können sie auch durch elektrische Reizung ausgelöst werden.

Grundlegende und wichtige Eigenschaften der Erregungsvorgänge bei Nervenzellen sowie der Weiterleitung neuronaler Signale sollen in diesem Kursteil experimentell untersucht werden. Eine geeignete Methode, um Nervensignale zu erfassen, ist die extrazelluläre Ableitung der Potentialänderungen an der Zellmembran des freiliegenden Nervenpräparates (z.B. Nerv-Muskel-Präparat eines Frosches) mit Hilfe feiner Metallelektroden. Am intakten Regenwurm lassen sich sogar die Nervenimpulse einzelner gut bekannter Nervenfasern mit Metallelektroden an der Hautoberfläche messen, ohne dass das Tier erst präpariert werden muss.

Neben tausenden von kleinen Nervenfasern besitzt der Regenwurm in seinem Bauchmark drei **Riesenfasern** mit besonders grossem Durchmesser (siehe Abb. 1). Die mediane Riesenfaser hat einen Durchmesser von bis zu 0,07 mm, die beiden lateralen Riesenfasern erreichen bis zu 0,05 mm. Die mediane Riesenfaser besteht aus einer Nervenzelle pro Körpersegment, die über eng aneinanderliegende Membranscheiben, den sogenannten Septen, mit den entsprechenden Nervenzellen der Nachbarsegmente in Verbindung stehen. Zum Teil sind die Membranen im Bereich der Septen sogar aufgelöst, so dass durchgehende protoplasmatische Verbindungen zwischen benachbarten Zellen bestehen. Dort wo die Membranen eng aneinanderliegen, können sich Membranporen, sog. „gap-junctions“, ausbilden. Über diese, sowie die direkten Verbindungen werden die elektrischen Ströme eines Aktionspotentials gut weitergeleitet. Die mediane Riesenfaser entspricht daher funktionell einem einzigen Axon. Die beiden

lateralen Riesenfasern sind ähnlich aufgebaut, aber zusätzlich noch über Querbrücken miteinander verbunden. Auf diese Weise bildet dieses Paar eine funktionelle Einheit.
Die Riesenfasern sind ein Glied in der neuronalen Verschaltung, die der Meidereaktion des Regenwurms zugrundeliegt. Sie erhalten ihre Signale von **Riesen-Interneuronen**, die ihrerseits wieder von Rezeptorzellen (**Mechanorezeptoren** des Hautmuskelschlauches) erregt werden. Von den Riesenfasern wird die Erregung dann auf segmentale **Riesen-Motoneurone** verschaltet und an die Muskulatur weitergeleitet; dies führt dann zur Rückzugsbewegung des Tieres. Dabei leitet die mediane Riesenfaser Erregungen von vorne nach hinten, während das laterale Riesenfasersystem Alarmsignale von hinten nach vorne vermittelt.

Um Aktionspotentiale möglichst schnell weiterzuleiten, wurden in der Evolution drei verschiedene Prinzipien entwickelt: 1. Die Vergrößerung des Axondurchmessers; 2. Die Ausbildung von Myelinscheiden, die an definierten Stellen unterbrochen sind, um eine „saltatorische Erregungsleitung“ zu ermöglichen; 3. Elektrische Synapsen, die dafür sorgen, dass die Weiterleitung der Nervensignale von einer Zelle zur nächsten sehr schnell vonstatten geht. Die mediane Riesenfaser hat einen großen Durchmesser und verfügt über elektrische Synapsen. Auch eine einfache Form der Myelinisierung ist vorhanden, saltatorische Erregungsleitung wie bei Vertebraten kommt hier jedoch nicht vor.

2 Vorraussetzungen für die Versuchsdurchführung

2.1 Theoretische Vorkenntnisse

Neuroanatomie: Neuron, Soma, Axon, Dendrit, Kollaterale, Synapse, Nerv, myelinisierte und nicht-myelinisierte Fasern, afferente Fasern, efferente Fasern.
Aufbau und Funktionen der Zellmembran: Phospholipide, Ionenkanäle, Ionenpumpe, physikalische Eigenschaften (Isolator-Wirkung, Kondensatoreigenschaften)
Ruhepotential: Intrazelluläre Potentialmessung, Größe des Ruhepotentials, Nernst´sche Gleichung, Ionenkonzentrationen intra- und extrazellulär, Permeabilitäten für Na^+ und K^+, elektrisches Ersatzschaltbild für die Entstehung des Ruhepotentials, Veränderung des Ruhepotentials bei Änderung der Na^+- und K^+ Konzentration, Membranzeitkonstante, Membranlängskonstante.
Aktionspotential: Unterschiede zu graduierten Potentialen, Zeitverlauf der APs, Erregungsschwelle, Alles-oder-Nichts-Regel, Permeabilitäten für Na^+ und K^+ während

des APs, Na+-Kanalfunktion mit Inaktivierung, relative und absolute Refraktärzeit, Veränderung des APs bei Änderung der Na^+- und K^+ - Konzentration, Unterschiede zwischen intrazellulär und extrazellulär abgeleiteten APs.

Fortleitung der APs: Unterschied zwischen lokaler und fortgeleiteter Erregung, Erregungsleitung an myelinisierten und nicht – myelinisierten Nervenfasern, Abhängigkeit der Leitungsgeschwindigkeit vom Faserdurchmesser.

Morphologie: Morphologie des Regenwurms, Aufbau des Bauchmarks von Evertebraten.

Methoden zur Messung und Darstellung von elektrischen Potentialen an/in der Zelle: Intrazelluläre Ableitung, extrazelluläre Ableitung, Oszilloskop (Aufbau, Funktion)

2.2 Literatur zur Vorbereitung

- **Heinzel, H.-G. : Neurophysiologische Versuche am intakten Regenwurm, Biologie in unserer Zeit 20:308-313 (1990)**.
  Dieser Originalartikel enthält die Versuchsbeschreibungen und ist **Pflichtlektüre VOR dem Versuch**. Vorlagen können als pdf-File von der Tierphysiologie-Homepage heruntergeladen oder zum Kopieren im Sekretariat Heldmaier ausgeliehen werden.
- **Vömel, M., Pfeiffer, K.: TPK-Versuch F: Neurophysiologie.**
  http://online-media.uni-marburg.de/biologie/tierphysiologie/nerven/regenwurm.htm
- **Dudel, J., Menzel, R., Schmidt, R. F.: Neurowissenschaft.** 2. Auflage (2001), Springer Verlag, Berlin.
- Eckert, R. : Tierphysiologie. 4. Auflage (2002), Thieme, Stuttgart (Standard-Lehrbuch)
- Kaestner, A. : Lehrbuch der speziellen Zoologie. Bd. 1, 3. Teil, 4. Auflage (1982), Fischer Stuttgart (Darstellungen vom Bauplan des Regenwurms und dessen Bauchmark)
- Kückenthal: Leitfaden für das Zoologische Praktikum (versch. Auflagen, gut für die Morphologie).
- **Penzlin, H. : Lehrbuch der Tierphysiologie.** 7. Auflage (2005), Spektrum Verlag, Heidelberg (Standard–Lehrbuch)

2.3 Weiterführende Literatur

- Drewes, C. D., Landa K. B., McFall J. L.: Giant nerve fibre activity in intact, freely moving earthworms. J. Exp. Biol. 72: 217-227 (1978).
- Günther, J.: Mikroanatomie des Bauchmarks von Lumbricus terrestris L. Z. Morph. Tiere 70: 141-182 (1971).
- Günther, J., Walther J. B.: Funktionelle Anatomie der dorsalen Riesenfaser-Systeme von Lumbricus terrestris L. Z. Morph. Tiere 70: 253-280 (1971).
- Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. : Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. J. Physiol. 116: 449-472 (1952). (klassischer Artikel: Erstbeschreibung der Messung von Transmembranströmen am Neuron)

2.4 Vorbereitungsfragen

Was ist ein Nerv? Was ist ein Ganglion? Welche Ionen sind hauptsächlich an der Entstehung des Ruhepotentials/ Aktionspotentials beteiligt? Was ist ein Axon, was ein Dendrit? Was ist der Unterschied zwischen graduierten und Aktionspotentialen, in welchen Kompartimenten eines Neurons sind sie zu finden? Was besagt die Nernst-Gleichung?

3 Versuche

Für die Versuche bitte mitbringen: Schreibzeug, 1 USB-Stick pro Teilgruppe, Gute Laune

3.1 Versuchsaufbau und Datenerfassung

Wurm mit Leitungswasser abwaschen und mit dem Vorderende nach links zwischen die Moosgummistreifen mit der Ventralseite (die hellere Seite) nach unten auf die Stecknadeln der Messkammer legen. Zwei Moosgummistopfen vor das Wurm-Vorderende und –Hinterende plazieren. Das Plexiglaslineal über den Wurm legen und mit mehreren Gummibändern befestigen (siehe Abb. 1). Verschaltung siehe Versuchsaufbau, Abb. 2. Einstellungen am Bioverstärker: EMG, Verstärkung X 1000.

Als Kontrolle des Versuchsaufbaus sollte der Borstenreizgeber ausgelöst werden. Auf dem Computerbildschirm sollten dann lediglich Rauschsignale oder Einstreusignale des Leitungsnetzes auftreten, deren Amplitude kleiner als 10 mV sind, d.h. an dem Wurm treten um den Faktor 1000 kleinere Signale auf (10 µV), da der Verstärker alle

Signale tausendfach verstärkt dem Computer zuführt. Prüfen Sie die Masseverbindungen, falls grössere Störsignale auftreten.

Die Ableitsignale der einzelnen Versuchsteile, die mit dem Computer aufgezeichnet werden, sollten als entsprechende Files zum späteren Ausdruck abgespeichert werden. **Da für das Protokoll jede Achse der Ableitspur-Aufzeichnung zu beschriften und die einzelnen am Computer eingestellten Darstellungsparameter anzugeben sind, unbedingt dafür Notizen während des Versuchs machen.**

3.2 Graphische Darstellungen des Versuchsaufbaus

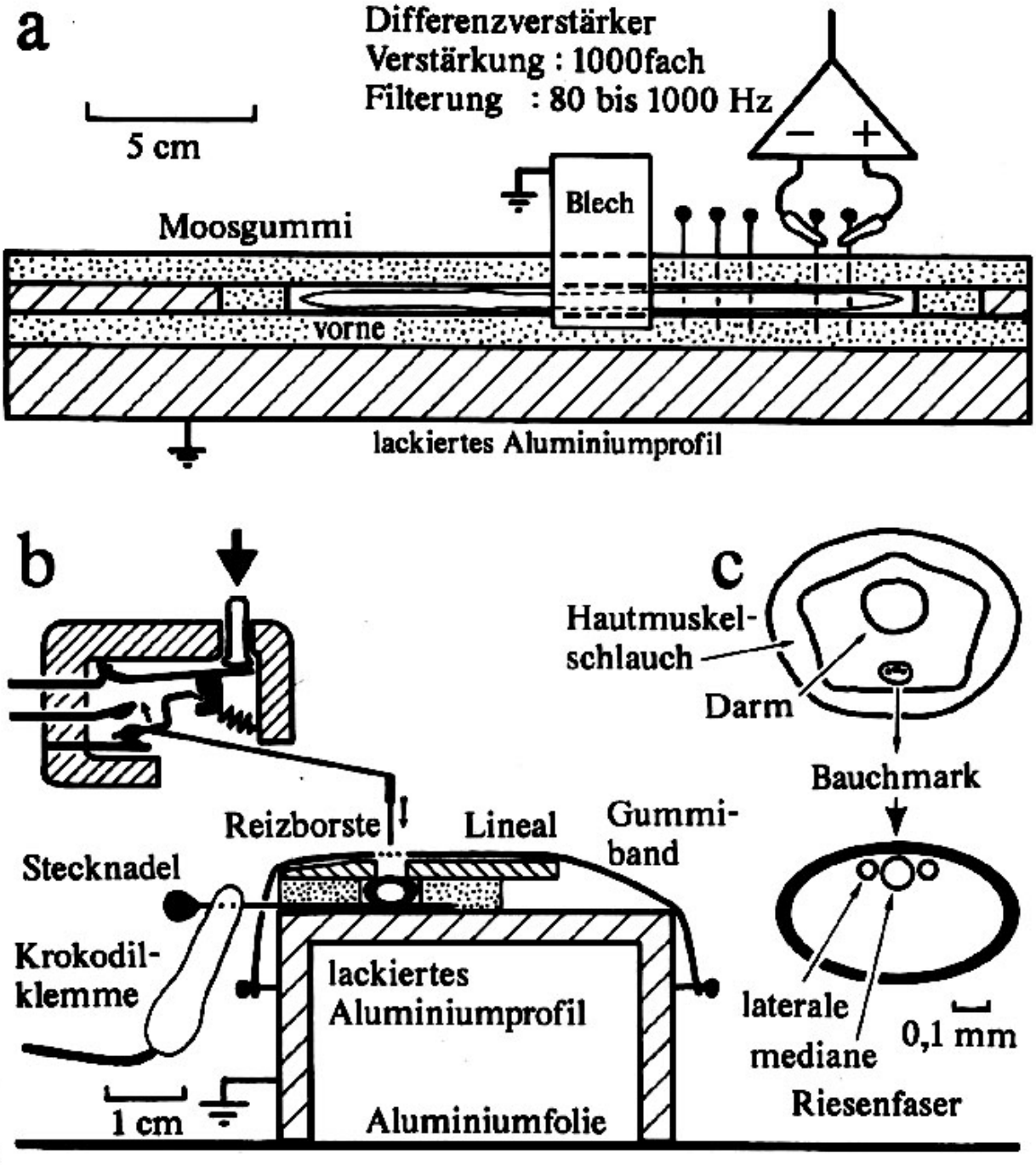


Abb. 1: Schematische Detaildarstellungen zum Versuchsaufbau und zum Bauchmark-querschnitt. Die Messkammer mit eingelegtem Wurm: Aufsicht (a), Querschnitt (b). Der Wurm kann durch kleine, im Plexiglaslineal vorhandene Löcher mit einer an einem Mikroschalter befestigten Borste mechanisch gereizt werden (ohne ihn zu verletzen). Die Potentiale der Muskeln und des Bauchmarks (c: schematische Querschnitte von Wurm und Bauchmark) werden von Stecknadelelektroden an der Haut abgegriffen und lassen sich nach Verstärkung und A/D-Wandlung mit dem Computer registrieren und abbilden.

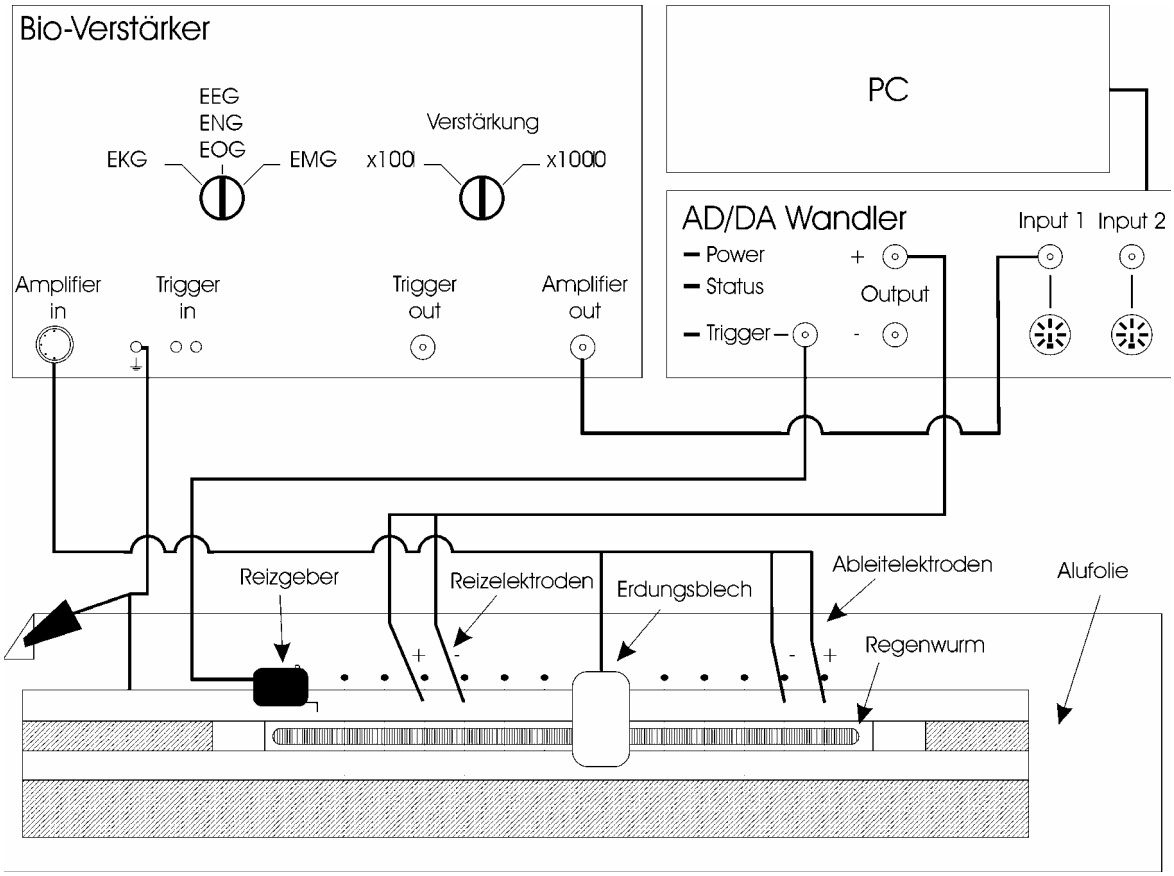


Abb. 2: Darstellung der Versuchsanordnung und der Verschaltung der zu verwendenden Geräte bei mechanischer Reizung des Regenwurms.

3.3 Die Reflexe des Regenwurms

3.3.1 Aufgaben

Messung von APs der lateralen und der medianen Riesenfasern, von Summenaktionspotentialen der Riesenmotoneurone und von Muskelpotentialen der Längsmuskulatur nach mechanischer Reizung des intakten Wurms. Analyse von Form, Dauer und Amplitude dieser Potentiale. Messung der Reaktionszeit des Wurmes als Gesamtlatenzzeit zwischen dem Reiz und dem Auftreten der APs.

3.3.2 Experiment

Bei Reizung des Wurmhinterendes werden APs der lateralen Riesenfasern ausgelöst und bei starker Reizung auch Muskelpotentiale (MPs) der Längsmuskeln (s. Heinzel, Abb. 2). Bei Reizung des Wurmvorderendes werden APs der medianen Riesenfaser ausgelöst, sowie APs von Riesenmotoneuronen, die sich, da sie annähernd gleichzeitig

auftreten, in der Messung zu einem Summenaktionspotential (SAP) summieren. Auch hier treten MPs der Längmuskulatur auf (s. Heinzel, Abb. 3).

Die Reizstärke können Sie dadurch variieren, dass Sie den Borstenreizgeber im Augenblick des Auslösens unterschiedlich weit von der Wurmoberfläche entfernt halten. Die vorschnellende Borste dellt dann die Haut des Wurmes unterschiedlich stark ein. Vor (!) der Betrachtung des Messresultates auf dem Bildschirm sollten Sie ihren jeweiligen Reiz in drei Kategorien einordnen: 1. Schwacher Reiz, die Borstenspitze berührt den Wurm nur ganz leicht; 2. Mittelstarker Reiz, leichte Eindellung der Haut; 3. Starker Reiz, die Haut wird um 0,5 mm und mehr eingedellt.

Reizen Sie den Wurm möglichst an der jeweils äussersten Spitze des Körpers. Beachten Sie, dass der Wurm an der vordersten Spitze am empfindlichsten ist. Am Hinterende sollten Sie nicht häufiger als alle 15 s reizen, am Vorderende höchstens einmal pro Minute; sollten Sie dies trotzdem tun, betrachten Sie das jeweilige Ergebnis kritisch (Warum?, Welches Phänomen lässt sich hier eventuell beobachten?) Falls der Wurm sich nach einem starken Reiz zusammenzieht, verändert er seine Lage relativ zu den Stecknadelelektroden. Achten Sie auf die Lage der angeschlossenen Stecknadeln, schliessen Sie gegebenenfalls die für die Ableitung zu verwendenden Krokodilklemmen an andere Stecknadeln an und protokollieren Sie deren Lage relativ zum Reizort vor (!) dem nächsten Reiz. Speichern Sie die erhaltenen Ableitungen.

3.3.3 Auswertung

Messen Sie Dauer und Amplituden der Nerven- und Muskelpotentiale und finden Sie Kriterien zu deren Unterscheidung. Bei welchen Reizstärken treten MPs und Zuckreflexe auf? Wo ist der Wurm empfindlicher, vorn oder hinten? Warum? Bewerten Sie die Empfindlichkeit nach der Zahl der ausgelösten APs der jeweiligen Riesenfaser, die auftreten müssen, bevor ein Muskelpotential auftritt. Wie unterscheidet sich die Reaktion auf starke bzw. schwache Reize am Wurmvorder- oder Hinterende? Wo und bei welchem Reiz ist ein SAP zu finden? Lässt sich bei Reizung am Vorder- oder Hinterende das Phänomen der synaptischen Bahnung beobachten (In diesem Falle müsste sich eine Vergrößerung der Amplitude bei den Muskelpotentialen, beobachten lassen)? Ermitteln Sie die Gesamtlatenzzeiten für eine Serie von verschieden starken Reizen; hängt die Latenzzeit von der Reizstärke ab? Wenn ja: Wie und weshalb?

3.4 Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Nervenimpulse / Detaillierter Zeitverlauf des biphasischen Aktionspotentials

3.4.1 Aufgaben

Direkte Messung und Abschätzung der verschiedenen Fortleitungsgeschwindigkeiten für die Nervenimpulse der medianen und lateralen Riesenfasern. Darstellung und Diskussion des zeitlichen Verlaufs eines abgeleiteten APs unter Berücksichtigung der Elektrodenanordnung.

3.4.2 Experiment

Reizen Sie den Wurm wie unter 3.3.2 und notieren sie die Gesamtlatenzzeit, d.h. die Zeitspanne zwischen Reizzeitpunkt und Auftreten des ersten APs. Dann verändern Sie die Position der Ableitelektroden, indem Sie die beiden Krokodilklemmen an zwei andere Stecknadeln anschließen. Reizen Sie den Wurm erneut und notieren Sie erneut die Gesamtlatenzzeit. Ermitteln Sie die Latenzzeit außerdem nach der Abschätzungsmethode (s. Heinzel).

Variieren Sie den Abstand zwischen den beiden angeschlossenen Stecknadeln, z.B. von den üblichen 10 mm auf 30 mm oder 40 mm. Führen Sie 3 bis 5 Messungen bei Reizung des Vorderendes und des Hinterendes durch. Speichern Sie die erhaltenen Ableitungen.

3.4.3 Auswertung

Messen Sie die Leitungszeiten für beide Fasertypen als die Zeiten zwischen den Spitzen von APs, die an den beiden Messstellen auftreten, und berechnen Sie aus dem Leitungsweg nach der Formel „Geschwindigkeit=Weg/Zeit“ die Fortleitungsgeschwindigkeit. Bei starker Reizung des Hinterendes erhalten Sie eine Serie von Nervenimpulsen der lateralen Riesenfasern. Hier können Sie beobachten, dass die zweiten und folgenden Impulse einer Serie schneller (ca. 10%) fortgeleitet werden als der erste.

Beobachten Sie die Form des Nulldurchgangs eines biphasischen Potentials bei vergrößertem Elektrodenabstand. Je nach den Ableitbedingungen (unterschiedliche Hautwiderstände an den beiden Ableitorten) kann das Plateau auch sehr schräg werden und die beiden Halbwellen können verschiedene Amplituden haben. Auf jeden Fall wird aber der bei kurzem Elektrodenabstand glatte Nulldurchgang bei Vergrößerung des

Elektrodenabstandes durch eine zusätzliche Potentialkomponente unterbrochen. Manchmal lässt sich auch bei dem zunächst üblichen Elektrodenabstand von 10 mm bereits eine leichte Verzögerung der Messspur im Nulldurchgang beobachten, welche Ihnen vielleicht zuvor nicht aufgefallen ist; dies bedeutet dann, dass das AP in seiner räumlichen Ausdehnung fast genau zwischen die beiden Elektroden im Abstand von 10 mm passt.

Messen Sie die Dauer mehrerer (z.B. 6) Potentialhalbwellen, ermitteln Sie den Mittelwert und geben Sie die Anzahl der Messungen an (Angabe im Protokoll wie im folgenden Beispiel: 100 m/s Γ50 m/s, n=6). Machen Sie sich die theoretische Betrachtung über die Ausbreitung von Aktionspotentialen und deren Messung klar.

3.5 Nerven sind elektrisch erregbar

3.5.1 Aufgaben

Bestimmung der Reizschwelle und Leitungsgeschwindigkeit der medianen und lateralen Fasern nach elektrischer Reizung.

3.5.2 Experiment

Schließen Sie zwei Reizelektroden an den Ausgang des AD/DA-Wandlers an. Betäuben Sie einen Wurm solange (ca. 10 min) mit Chloreton, bis sein Hautmuskelschlauch schlaff ist. Der abgetrocknete Wurm wird dann wie zuvor in die Apparatur gelegt. Beim Anbringen des Erdungsblechs ist darauf zu achten, dass es zwischen den Reiz- und den Ableitelektroden zu liegen kommt. Reizen Sie mit einer Impulsdauer von 0,5 ms und erhöhen langsam die Reizstärke von 0 V ausgehend. Speichern Sie die erhaltenen Ableitungen.

3.5.3 Auswertung

Bestimmen Sie die Reizschwelle für die Median- und die Lateralfasern. Gibt es dabei einen Unterschied, warum? Bestimmen Sie die Latenzzeit und berechnen Sie daraus die Leitungsgeschwindigkeit für beide Fasertypen (s. Heinzel, Abb. 8).

3.6 Übertragunskapazität von Nerven

3.6.1 Aufgaben

Bestimmung der Refraktärzeit der Medianfaser, Vergleich der Aktionspotentialabstände mit den Reizabständen

3.6.2 Experiment

Der Aufbau folgt 3.5.2. Reizen Sie anfänglich mit Doppelpulsen von ca. 5 Hz, und erhöhen Sie dann langsam die Reizfrequenz.

3.5.3. Auswertung

Bestimmen Sie aus Ihren Ableitungen die Refraktärzeit (s. Heinzel, Abb. 9). Zeigen Sie anhand Ihrer Daten das Phänomen der synaptischen Bahnung.

4. Nach diesem Praktikum sollten Sie in der Lage sein,

- die theoretischen Grundlagen für diesen Versuch darzustellen.
- den Unterschied zwischen intrazellulären und extrazellulären Ableitungen zu erklären.
- den Entstehungsmechanismus des biphasischen APs zu erklären.
- die Größenordnungen der Amplituden der vom Regenwurm extrazellulär abgeleiteten APs anzugeben.
- die ungefähre Dauer eines biphasischen APs anzugeben.
- den Zusammenhang zwischen Faserdurchmesser und Leitungsgeschwindigkeit zu beschreiben.
- anzugeben, wie man die Impulsfortleitungsgeschwindigkeit bestimmt.
- die Leitungsgeschwindigkeit der beiden Riesenfasertypen anzugeben.
- den Versuchsaufbau zu skizzieren.
- Die in Ihrem Protokoll aufgeführten Potentialkurven zu skizzieren.
- Unterschiede in den Potentialableitungen nach Reizung mit unterschiedlichen Reizintensitäten am Wurmvorder- bzw. des Wurmhinterendes zu nennen.
- Unterschiede im Aufbau des Nervensystems von Vertebraten und Anneliden zu nennen.

KURS G: MUSKELPHYSIOLOGIE

1. Einleitung

Muskeln setzen chemische Energie direkt in mechanische Energie um. In diesem Praktikumsteil sollen Sie sich die elektrischen und mechanischen Eigenschaften von Skelettmuskeln erarbeiten.

2. Grundkenntnisse

Erarbeiten Sie sich bei der Vorbereitung auf den Kurs folgende Grundkenntnisse anhand der angegebenen Literatur:

Anatomie quergestreifter Muskelfasern (Sarkolemm, Myofibrillen, Sarkomer, Actin, Myosin, Z- Scheibe, A- und I-Banden, H-Zone, transversale Tubuli, sarkoplasmatisches Reticulum, motorische Endplatte); glatte Muskelfasern; Herzmuskelfasern; Bau der Muskulatur bei Vertebraten und Invertebraten

Molekularer Mechanismus der Kontraktion (Verkürzung der Sarkomere, Querbrücken, ATP, elektromechanische Kopplung, Muskelaktionspotential, Rolle der Ca^{++}-Ionen)

Muskelmechanik (isometrische, isotonische Kontraktion; elastische und plastische Eigenschaften, Ruhedehnungs- und Entlastungskurve, Tetanus, isotonische, isometrische Maxima (s. Penzlin, S. 860), Regulation der Muskelkraft: motorische Einheiten, phasische und tonische Muskelfasern)

Motorische Endplatte (Bau, Endplattenpotential, Transmitterwirkung, Abbau des Acetylcholins, synaptische Latenz, neuromuskuläre Organisation bei Arthropoden)

Wirkung elektrischer Reize (Depolarisation, Hyperpolarisation, Auslösung und Zeitverlauf der Ionenströme während eines Aktionspotentials, Mechanismus der Fortleitung eines Aktionspotentials, Refraktärzeit).

2.1 Literatur zur Vorbereitung

Penzlin H (2005) Lehrbuch der Tierphysiologie. 7. Auflage, Elsevier/Spektrum, München, insbesondere Kapitel 23.

Deetjen P, Speckmann E-J, Heschler J (2005) Physiologie. 4. Auflage, Elsevier, München, Kapitel 4 (besonders anschauliche Darstellungen !)

Randell D, Burggren W, French K (2002) Eckert Animal Physiology. 5th Edition, Freeman, New York, speziell Chapter 10.

Schmidt RF, Schaible H-G (2000) Neuro- und Sinnesphysiolgie. 4. Auflage, Berlin, Springer, insbesondere Kapitel 4.

3. Versuche: Kontraktionsverhalten des Musculus adductor pollicis in der Hand des Menschen

Der Musculus adductor pollicis ist ein Muskel des Daumenballens, der fächerförmig vom ulnaren Sesambein zu Ansatzstellen am Mittelhandknochen des Mittelfingers und zu Handwurzelknochen zieht (Abb. 2). Die Kontraktion des Muskels führt zum Heranziehen des Daumens. Der M. adductor pollicis wird von Motoneuronen des Nervus ulnaris versorgt. Der N. ulnaris verläuft an der medialen Seite des Oberarms, oberflächlich über das Ellenbogengelenk („Musikantenknochen“) und versorgt über den Ramus profundus die Hand. Über elektrische Reizung des N. ulnaris mittels Hautelektroden sollen die Kontraktionseigenschaften des M. adductor pollicis untersucht werden. Der Versuch wird als computergesteuertes Experiment mit Hilfe eines Myographen durchgeführt (Abb.1). Die Reizparameter werden über eine Bedienungsoberfläche zentral gesteuert, die gewonnenen Messdaten „on-line“ im Computer erfasst und verarbeitet und können schließlich ausgewertet, graphisch dargestellt und ausgedruckt werden.

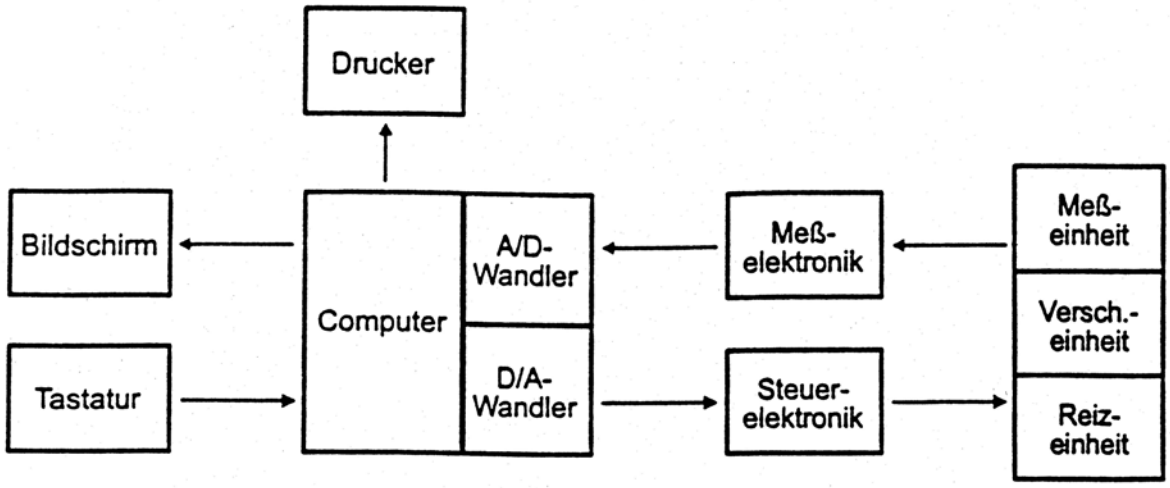


Abb. 1: Modularer Aufbau des Myographen

3.1 Verschienung des Unterarms

Die Verschienungseinheit dient in erster Linie dazu, alle störenden Bewegungen der Extremität auszuschalten. Die zu untersuchenden Zielbewegungen bzw. -kräfte sollen sich dagegen voll auf die Apparatur übertragen. Vor der Verschienung wird zunächst die Lage der Bewegungsachse des Daumengrundgelenks mit einem Punkt auf der Handinnenfläche (Filzstift) markiert. Es ist zu beachten, dass beim Daumengrundgelenk die von außen tastbaren Gelenkflächen nicht selbst die Lage der eigentlichen Bewegungsachse markieren, sondern kreisbogenförmig um einen gedachten Kreismittelpunkt herum angeordnet sind. Auf der walzenförmigen Oberfläche des Daumengrundgelenks wird der Daumen im Abstand des Walzenradius um die Bewegungsachse herumgeführt; der Kreismittelpunkt bildet dann die Bewegungsachse. Zum Auffinden der Bewegungsachse führt man Daumenbewegungen aus, während ein Stift über die Daumeninnenfläche gehalten wird. Der Punkt ist dann gefunden, wenn sich die Haut unter dem Stift bei Bewegung des Daumens nicht mehr kreisbogenförmig bewegt.

Vor der Verschienung muss der Muskelradius gemessen werden (Abb. 2 rechts), um von den Daten der Kraftmessung auf reale Muskelkräfte schließen zu können. Voraussetzung hierfür ist eine Reduktion des Muskels auf eine einfache idealisierte Form. Der reale Muskel besteht aus Fasern unterschiedlicher Länge und Ausrichtung. Unter der Annahme, dass ein Kreisbogen (Abb. 2 rechts) die funktionelle Resultante

eines Muskelfächers hinreichend simuliert, kann man den M. adductor pollicis auf die Form eines Kreisfächers reduzieren, der auf den distalen Rand des Muskelfächers projiziert wird. Die reale Muskelkraft wirkt über den Muskelradius auf die Drehachse im Daumengrundgelenk und wird über ein Übersetzungsrad („Übersetzungsradius“, hier 35 mm) auf den eigentlichen Kraftmesser übertragen. Es gilt die Beziehung:

Muskelkraft x Muskelradius = Messkraft x Übersetzungsradius

Da sowohl der Übersetzungsradius als auch die Umrechnungsformel bereits softwaremäßig berücksichtigt wurden, ist nur noch die Messung und Eingabe des jeweiligen Muskelradius notwendig, um hinreichende Aussagen über reale Muskelkräfte bzw. -längen zu erhalten.

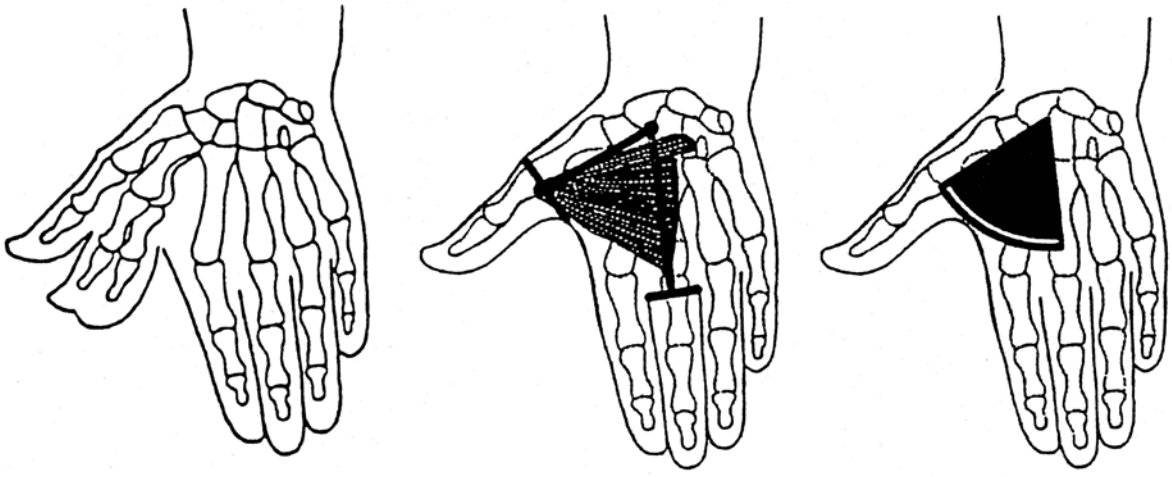


Abb. 2: Das walzenförmige Daumengrundgelenk ermöglicht eine kreisförmige Bewegung des Daumens um einen gedachten Kreismittelpunkt. Die Bildmitte zeigt Ursprung und Ansatz des fächerförmigen M. adductor pollicis, überlagert von markanten Eckpunkten seiner Bewegungsfläche; rechts ist die geometrische Idealisierung des Muskels verdeutlicht.

Handfläche und Unterarm werden anschließend in der Verschienungseinheit fixiert. Die Lage der Schiene wird in der vertikalen Ebene so lange variiert, bis die Punktmarkierung auf der Handinnenfläche mit der Drehachse der Apparatur exakt übereinstimmt. Als Peilhilfe wird ein Lichtpunkt in Richtung der Drehachse auf die Handinnenfläche projiziert. Anschließend wird der Daumen fixiert.

3.2 Auslösung der Kontraktion

Zur Auslösung der Kontraktion wird der **Nervus ulnaris** elektrisch gereizt. Je weiter distal der Nerv gereizt wird, umso weniger Muskeln werden vom (Rest-) Nerven versorgt, bzw. durch Reizung erregt. Wegen der oberflächennahen Lage wird zur Kontraktion des **Musculus adductor pollicis** im Versuch am Reizort b (Abb. 3) des Ellenbogens (Epicondylus medialis) gereizt.

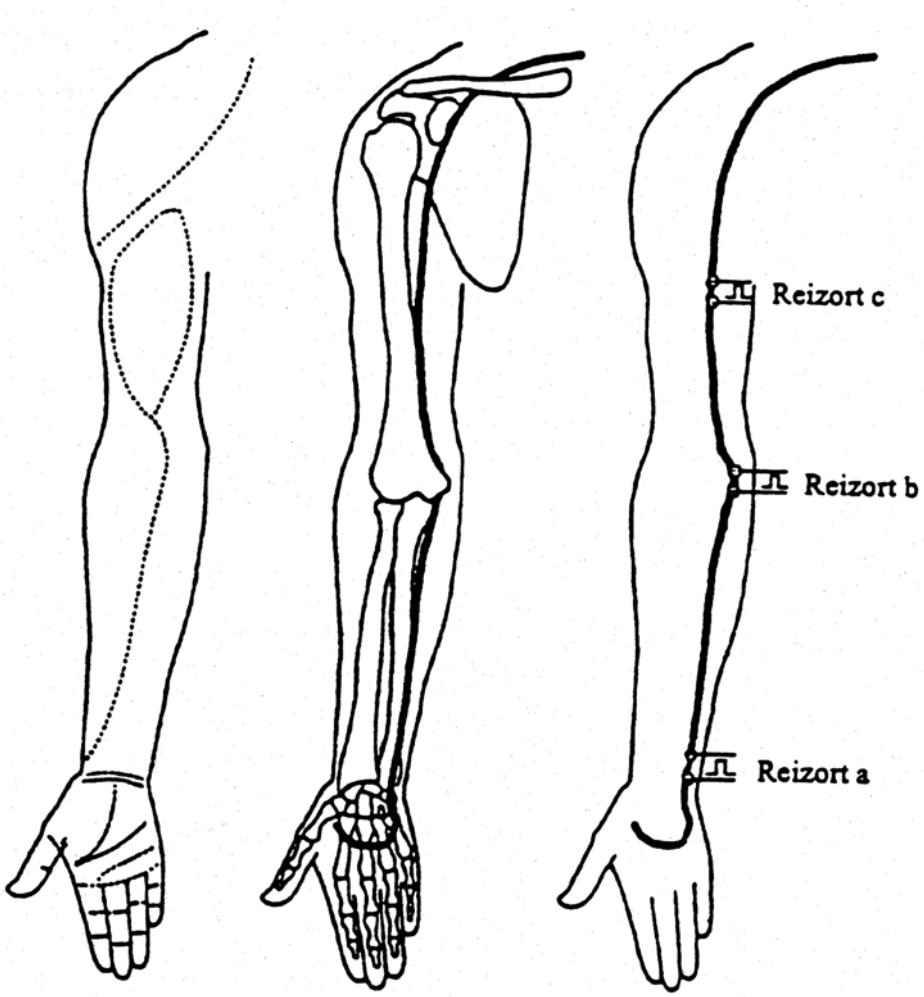


Abb. 3: Lokalisation der günstigsten Nervenreizpunkte für den Nervus ulnaris

Zur Reizapplikation werden Oberflächenelektroden verwendet. Um den benötigten Reizstrom niedrig halten zu können, werden die Filzelektroden in Salzwasser (gesättigte NaCl-Lösung) getränkt, bevor sie in ihre Metallhalterungen eingesetzt werden. Mit kleinen Probeimpulsen wird das Hautareal aufgesucht, auf dem die Oberflächenelektroden genau in Längsrichtung über dem Nervus ulnaris liegen. Wenn der genaue Reizort gefunden ist, kann der Übergangswiderstand zur Haut weiter

vermindert werden, indem die Haut mit einem mit etwas Äther oder Aceton getränktem Lappen von Fett gereinigt wird. Danach werden die Elektroden mit einem Klebestreifen über dem Hautareal befestigt und mit einem Gurt straff angedrückt. Um ein Verrutschen der Elektroden während des Versuchs zu verhindern, empfiehlt es sich, die Elektroden mit der freien Hand leicht anzudrücken. Zur Aktivierung der efferenten Nervenfasern des N. ulnaris wird Kathodenreizung eingesetzt. Konventionsgemäß wird damit die distale Elektrode gegenüber der proximalen elektronegativ sein. Im Computermenü können als Parameter die Reizstärke (in Milliampere), die Reizdauer (in Millisekunden) und die Reizfrequenz (in Anzahl der Reize pro Sekunde) variiert werden.

3.3 Versuchsdurchführung

Optimierung der Stimuli

Um die Plazierung der Reizelektroden zu optimieren, wird im Versuchsmenu die Option „Optimierung der Stimuli“ gewählt. Es werden hierbei jeweils 10 Reize (Dauer 0,1 msec) im Abstand von 1 Sekunde gegeben. Bei der ersten Reizserie wird eine Reizstärke von 6 mA eingestellt. Zwischen den Reizen werden die Reizelektroden leicht verschoben, um die optimale Position zu ermitteln (Kribbeln im kleinen Finger). In dieser Position werden die Elektroden fixiert. Gegebenenfalls ist die Reizserie mit erhöhter Reizstärke solange zu wiederholen, bis eine deutliche Empfindung im kleinen Finger verspürt wird.

Einzelreiz

Im Versuchsmenü wird die Option „Einzelreiz“ gewählt. Bei diesem Versuch soll bei übermaximaler Reizstärke und isometrischer Messung eine Einzelzuckung des Muskels ausgelöst werden und Muskelkraft, Elektro- und Phonomyogramm aufgezeichnet werden. Im Modus „Vorversuch“ wird in aufeinanderfolgenden Einzelreizen die Reizstärke von 6 mA solange erhöht, bis keine weitere Steigerung der auf dem Monitor registrierten Muskelkraft mehr auftritt. Mit übermaximaler Reizstärke wird dann der Hauptversuch durchgeführt und unter dem Namen der Versuchsperson gespeichert.

Steigende Reizserie

Im Versuchsmenü wird die Option „Steigende Reizserie“ gewählt. Beginnend mit einer Reizstärke von 0 mA wird eine Serie von Reizen bis zur übermaximalen Reizstärke gegeben. Der Versuch wird erst als Vorversuch und dann zur Speicherung der Daten als Hauptversuch durchgeführt.

Doppelreiz

Nach Auswahl des Menüs „Doppelreiz“ wird bei übermaximaler Reizstärke eine Serie von Doppelreizen gegeben, deren Frequenz von 2 Hz bis 1250 Hz gesteigert wird. Nach einem Vorversuch wird zur Datenspeicherung der Hauptversuch durchgeführt.

Tetanus

Im Versuchsmenu „Tetanus“ werden bei submaximaler Reizstärke fünf Reizserien gegeben: (a) 5 Reize mit 5 Hz, (b) 8 Reize mit 8 Hz, (c) 12 Reize mit 12 Hz, (d) 18 Reize mit 18 Hz und (e) 30 Reize mit 30 Hz. Nach einem Vorversuch zur Kontrolle der Versuchsapparatur wird der Hauptversuch durchgeführt.

Isotonische Maxima

Im Versuchsmenü „Isotonische Maxima“ wird durch Erhöhung der auf den Muskel wirkenden Hebelkraft der M. adductor pollicis zunehmend gedehnt. Bei jeder Dehnungsstufe wird bei übermaximaler Reizung die Kontraktionsamplitude gemessen. Im Vorversuch wird der Wert für die maximale Hebelkraft so eingestellt, dass bei ihr der Hebel gerade noch nicht den vorderen Anschlagpunkt berührt. Im Hauptversuch wird in 10 Schritten die Hebelkraft vom unteren Wert (ca. 10% der Maximalkraft) bis auf die Maximalkraft erhöht.

Isometrische Maxima

Im Versuchsmenü „Isometrische Maxima“ wird durch Erhöhung der auf den Muskel wirkenden Hebelkraft der M. adductor pollicis zunehmend gedehnt. Bei jeder Dehnungsstufe wird bei übermaximalem Einzelreiz die Kontraktionskraft gemessen. Im Vorversuch wird der Wert für die maximale Hebelkraft so eingestellt, dass bei ihr der Hebel gerade noch nicht den vorderen Anschlagpunkt berührt. Im Hauptversuch wird in

10 Schritten die Hebelkraft vom unteren Wert (ca. 10% der Maximalkraft) bis auf die Maximalkraft erhöht.

3.4 Auswertung der Messdaten

Im Datenaufnahme- und -auswertmenü unterscheiden wir einen Reizkanal, einen Kraftkanal, sowie einen Messkanal für das Elektromyogramm (EMG) und das Phonomyogramm (PMG). Das EMG ist das elektrische Summenpotential der Muskelerregung. Das PMG zeichnet den Muskelton auf, eine Oszillation der Myofibrillen (ca. 25 Hz), die beim Aneinandervorbeigleiten von Aktin und Myosin entsteht. Die Signale dieser Messkanäle werden im Modul der Messelektronik aufbereitet und so verstärkt, dass sie vom Computer verarbeitet werden können.

Die Daten aller Messkanäle können simultan auf einer Bildschirmseite des Computers untereinander dargestellt werden. Die kalibrierten Messsignale können mit hoher Auflösung ausgemessen und zeitlich exakt einander zugeordnet werden und schließlich als Funktionsgraphiken am Bildschirm dargestellt oder auf Drucker ausgegeben werden. Führen Sie folgende Auswertungen durch:

Einzelreiz

Vermessen Sie aus den Funktionsgraphen folgende Parameter:

- Höhe der maximalen Kraft
- Latenzen Reiz-EMG; EMG-PMG; PMG-Kraft
- Anspannungszeit, Erschlaffungszeit

Drucken Sie das Kraft-, EMG- und PMG-Diagramm aus. Diskutieren Sie die biphasische Form des EMG´s und PMG´s, sowie die Vorgänge, die sich während der drei gemessenen Latenzzeiten abspielen.

Steigende Reizserie

Erstellen Sie ein Diagramm, das die Muskelkraft in Abhängigkeit von der Reizstärke zeigt (Ausdruck). Diskutieren Sie die Kurve. Bei welcher Reizstärke beginnt die

Kraftentwicklung? Warum nimmt die Kraft bei steigender Reizstärke zu? Bei welcher Reizstärke ist keine weitere Kraftsteigerung mehr zu verzeichnen? Welcher Zustand ist in der Plateauphase erreicht?

Doppelreize

Erstellen Sie ein Diagramm, das die Muskelkraft in Abhängigkeit von der Reizfrequenz zeigt (Ausdruck). Diskutieren Sie die Kurve! Bei welcher Frequenz hat die Kraft ihr Maximum erreicht? Warum nimmt die Kraft bei hohen Frequenzen wieder ab? Bestimmen Sie aus den Daten die absolute und relative Refraktärzeit des Systems.

Tetanus

Drucken Sie die Rohdaten aus. Bei welcher Frequenz tritt ein unvollständiger/glatter Tetanus auf? Warum verschmelzen die Einzelzuckungen? Vergleichen Sie die maximale Kraftentwicklung bei Reizung mit Einzelreizen, Doppelreizen und im glatten Tetanus.

Isotonische Maxima

Erstellen Sie die Ruhedehnungskurve sowie die Kurve der isotonischen Maxima (Ausdrucke). Warum nimmt die aktive Kontraktionsamplitude bei übermaximaler Reizung mit zunehmender Vordehnung des Muskels ab?

Isometrische Maxima

Erstellen Sie die Ruhedehnungskurve sowie die Kurve der isometrischen Maxima (Ausdrucke)! Wie verändert sich die Kontraktionskraft mit zunehmender Muskellänge? Warum?

4. Erfolgskontrolle

Nach dem Praktikumsteil sollten Sie in der Lage sein:

- den anatomischen Feinbau von Skelettmuskelfasern zu beschreiben;
- die physiologischen Vorgänge von elektrischer Reizung am Nerv bis zur Kontraktion des Muskels zu erläutern (elektromechanische Kopplung);
- zu erklären, wie ein Tetanus entsteht;
- charakterisitische Unterschiede zwischen quergestreifter, glatter, und Herzmuskulatur darzustellen;
- den Unterschied zwischen isometrischer und isotonischer Kontraktion zu erklären;
- den prinzipiellen Verlauf der Kurve der isometrischen und isotonischen Maxima zu skizzieren;
- zu erklären, was tonische und phasische Muskelfasern sind;
- die wichtigsten Unterschiede in der neuromuskulären Organisation von Vertebraten und Arthropoden zu erläutern.

KURS H: SINNESPHYSIOLOGIE

1. Einleitung

Sinneszellen oder Rezeptoren sind spezialisierte Strukturen des Nervensystems, die Zustände und/oder Zustandsänderungen (Reize) aus der Umwelt (→ Exterorezeptoren) oder dem Körperinneren (→ Enterorezeptoren) aufnehmen und an das ZNS melden. Die zugeführte Reizenergie ist in der Regel um ein Vielfaches geringer als für den Erregungsvorgang benötigt wird, d.h. die Energie zum Aufbau des Rezeptorpotentials stammt aus dem Zellstoffwechsel, dem Reiz kommt nur eine auslösende Funktion ("trigger-Wirkung") zu. Während das Rezeptorpotential stets mit der Reiz-intensität proportional korreliert ist (Amplitudenmodulation), werden am Beginn des afferenten Axons diese graduierten Potentiale in ein bestimmtes Muster von Aktionspotentialen umcodiert (Frequenzmodulation), die dem Alles- oder Nichts-Gesetz gehorchen. Sinneszellen sind oft mit entsprechenden Hilfsstrukturen, die dem Reiztransport dienen, zu Sinnesorganen zusammengefaßt. Die Gesamtheit der an der Informationsaufnahme, Weiterleitung und -verarbeitung beteiligten Strukturen bezeichnet man als sensorisches System.

Während des heutigen Kurstages werden bestimmte Eigenschaften von Photorezeptoren (z.B. Kennlinie, zeitliches Auflösungsvermögen etc.) experimentell durch elektrophysiologische Ableitung (objektive Sinnesphysiologie) an einem Insekt (der Wanderheuschrecke *Schistocerca gregaria*) untersucht. Demgegenüber sollen durch Versuche der subjektiven Sinnesphysiologie (Empfindungen) im Selbstversuch Erkenntnisse über sensorische Systeme gewonnen werden (z.B. Hörschwellenbestimmung, Richtungshören, Zeitdifferenzschwelle des Hörens, zeitliches Auflösungsvermögen des Auges).

2. Grundkenntnisse

Theoretische Vorkenntnisse aus der Vorlesung „Grundlagen der Tierphysiologie“. Grundlegende Kenntnisse der Neurophysiologie (Bau und Funktion der Nervenzelle, Ruhepotential, Aktionspotential etc., siehe Kurs F), Kenntnisse über Anatomie von Insekten.

2.1 Allgemeine Sinnesphysiologie

Phasische und tonische Rezeptoren, Kennlinien, Beziehung zwischen Reiz → Rezeptorpotential → Impulsfolgefrequenz, adäquater Reiz, Rezeptortypen (Photorezeptoren, Mechanorezeptoren etc.), Hemmung.

2.2 Sehphysiologie

Bau und Funktion des Wirbeltierauges am Beispiel des menschlichen Auges:
Aufbau, dioptrischer Apparat, Bildentstehung, Akkomodation, Fehlsichtigkeit, Aufbau der Netzhaut, Photorezeptoren (Besonderheiten des Ruhe- und Belichtungspotentials), Sehpigmente und Transduktionsprozeß, Farbempfindlichkeit, Adaptation, räumliches und zeitliches Auflösungsvermögen.

Bau und Funktion des Insektenauges: Bau eines Ommatidiums, Appositionsauge, Superpositionsauge, neurales Superpositionsauge, Umwandlung der Photopigmente, Transformationsprozeß, räumliches Auflösungsvermögen, zeitliches Auflösungsvermögen (Flimmerverschmelzungsfrequenz), Spektralempfindlichkeit, Elektroretinogramm (ERG).

2.3 Hörphysiologie und Mechanorezeptoren

Bau und Funktion des menschlichen Ohres: Was ist Schall? Frequenz, Schalldruck, Dezibel (dB), Phon (heute dB(A)), Anatomie (Außen-, Mittel- und Innenohr), Hörschwelle, Basilarmembran, Haarsinneszellen, Wanderwellen, Ortsabbildung der Frequenz, Richtungshören.

2.4 Methodische Kenntnisse, die im Praktikum erworben werden sollen

Präparation des Insekts, einspannen in die Ableitapparatur (s. Skript, ausführliche Anleitung am Arbeitsplatz). Bedienung der verwendeten Software: Eine Einführung in die Bedienung (Trigger, Speichern, Bestimmung von Amplitude und Zeitmessung) der im Praktikum verwendeten Software, Vorverstärker und anderen technischen Geräte wird durch den Betreuer gegeben. Umgang mit Audiometer: Ausführliche Anleitung am Arbeitsplatz.

2.5 Literatur zur Vorbereitung

Dudel J, Menzel R, Schmidt RF (2000): Neurowissenschaft. Springer, Berlin, S.353 ff., S. 383 ff.

Penzlin H (1996): Lehrbuch der Tierphysiologie. 6. Auflage, Fischer, Jena, S. 406 ff., S. 441 ff.

Schmidt RF, Thews G (2000): Physiologie des Menschen. 26. Auflage, Springer, Berlin, S. 195 ff., S. 259 ff., S. 274 ff.

Eckert R, Randall D, Burggren W, French K (2000): Animal Physiology. 4th edition, Freeman, New York, S. 220 ff., S. 256 ff., S. 274 ff.

Weiterführende Literatur siehe in den Hinweisen der oben genannten Lehrbücher

2.6 Versuchsbeschreibungen

Hanke W, Hamdorf K, Horn E, Schueper C (1977): Praktikum der Zoophysiologie. 4. Auflage, Fischer, Stuttgart.

S. 192 - 194 Hörphysiologie

S. 235 - 241, S. 248 Sehphysiologie

Nachtigall W (1981): Zoophysiologischer Grundkurs. 2. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim.

S. 190 - 193 Hörphysiologie

S. 198 - 211 Sehphysiologie

Entsprechen beide recht gut dem experimentellen Teil des Praktikums.

2.7 Handwerkszeug

Wird gestellt; dennoch mitzubringen sind Schreibzeug und Protokollheft, ein USB-Stick pro Gruppe, sowie gute Laune ☺.

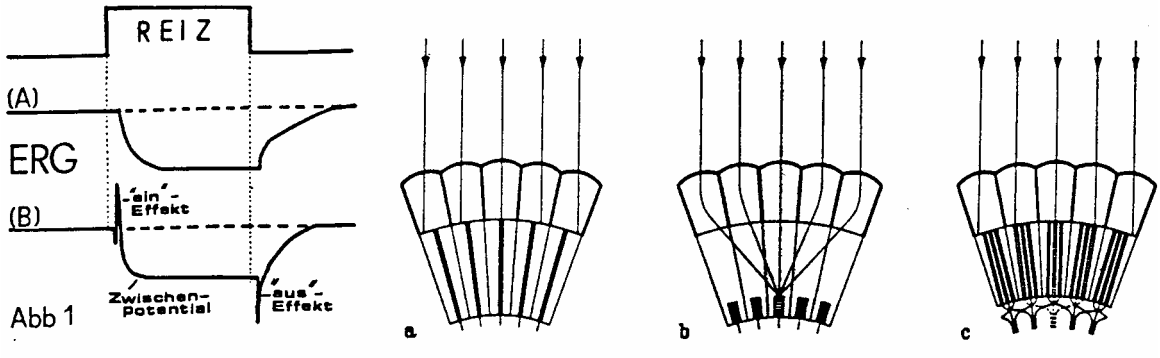


Abb.1: Links sind typische Elektroretinogramme mit monophasischem (A) und biphasischem (B) Verlauf zu sehen. Schematische Querschnitte durch die verschiedenen Komplexaugentypen mit den entsprechenden Strahlengängen sind in der rechten Zeichnung dargestellt (a: Appositionsauge, b: optisches Superpositinsauge, c: neurales Superpositionsauge)

3. Versuch A: Physiologische Untersuchungen am Komplexauge der Insekten

3.1 Elektroretinogrammableitungen am Komplexauge eines Insekts (ERG)

Zu den Leistungen eines optischen Systems gehören räumliches und zeitliches Auflösungsvermögen, spektrale Empfindlichkeit, absolute Lichtempfindlichkeit. Einige dieser Eigenschaften sollen im Insektenauge untersucht und falls möglich, mit dem menschlichen Auge verglichen werden.

Belichtet man das Auge von Wirbeltieren oder Wirbellosen, so treten infolge der Lichtabsorption der Photorezeptoren und des anschließenden Transduktionsprozesses Potentialschwankungen im Auge auf. Diese Summenpotentiale der gesamten elektrischen Aktivität des Auges kann man mit geeigneten Elektroden als Potentialdifferenz zwischen Auge und Umgebung ableiten. Die Potentiale haben z.T. komplizierte Kurvenverläufe, die bis heute nicht endgültig erklärt sind (vgl. Summenableitungen, EKG, EEG), die aber eine einfache Methode darstellen, um quantifizierbare Aussagen über Erregungsvorgänge in den Photorezeptoren zu machen. Die ERG-Kurve der Insekten ist z.B. stark von den Ableitbedingungen abhängig (Temperatur, Luftdruck, Alter der Präparate, Einstichtiefe der Ableitelektrode, Elektrodenmaterial, Eingangswiderstand des Verstärkers, etc.).
Während man bei "langsamen" Insekten (Bsp.: Heuschrecken, Schaben) tendenziell eher monophasische Potentialverlaufe (Abb.1 A) feststellen kann, sind bei schnellfliegenden Formen, zu denen die Schmeißfliege *Calliphora* zählt, diphasische Potentialverlaufe (Abb.1 B) charakteristisch. In dieser Form des diphasischen ERGs spiegelt sich sowohl die summierte Aktivität der Rezeptoren wieder als auch die Summenaktivität nachgeschalteter neuronaler Elemente, hauptsächlich des 1. optischen Ganglions (= Lamina).

3.2 Versuchsaufbau

Als Lichtquelle (L) dient ein Diaprojektor (250W). Das Licht kann durch einbringen verschiedener Graufilter in den Strahlengang in seiner Intensität verändert werden. Die Belichtungszeit (1 - 1/25s) ist am Photoverschluss verstellbar und für den Versuch auf 0.5s optimal eingestellt. Zur Abdunkelung des Versuchstieres und zur Abschirmung gegenüber elektrischen Störfeldern wird ein Kasten mit Faraday-Käfig über die Apparatur geklappt. Der Reizverlauf wird über eine Photozelle registriert und am PC dargestellt. Differente (DE) und indifferente Elektrode (IE) sind mit den Eingängen des Vorverstärkers (Differenzverstärker) verbunden, der sich ebenfalls im Faraday-Käfig befindet und die abgeleiteten Signale zum D/A-Wandler weiterleitet. Dieser sendet die

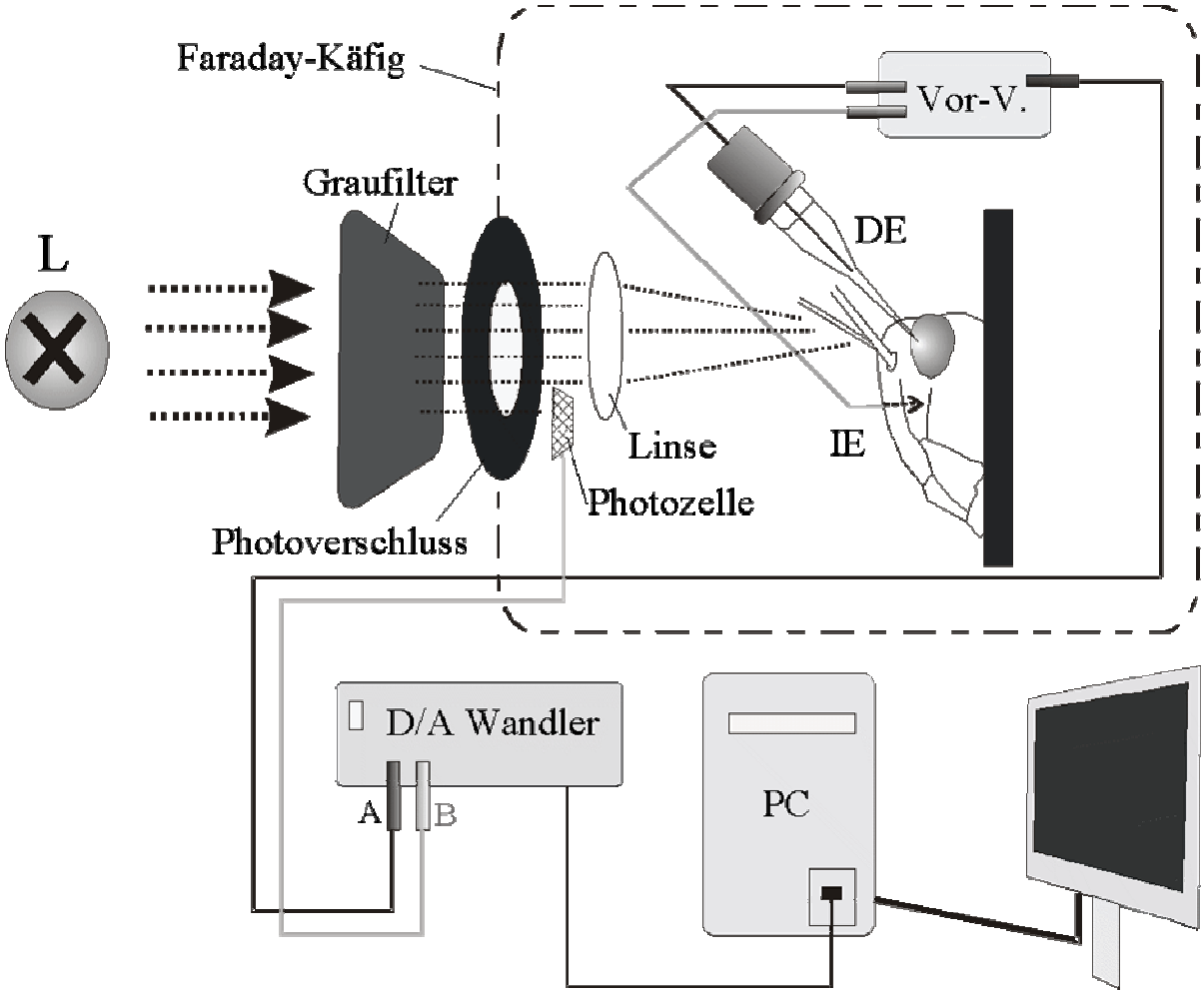


Abb.2: Schematischer Versuchsaufbau zum Kursteil Sehen. L=Lichtquelle, IE=Indifferente Elektrode, DE=Differente Elektrode, Vor-V.=Vorverstärker, D/A=Digital-Analog

digitalisierten Daten schließlich zum PC, wo die weitere Auswertung und Speicherung erfolgt.

3.3 Durchführung

Die Heuschrecke wird ca. 20 Minuten durch Kühlung betäubt, dann wird der Kopf abgetrennt und mit Hilfe einer Wachs-Kolophonium-Mischung auf einem Metallhalter festgeklebt.

Das Präparat wird nun in die vorgesehene Halterung gesteckt und kann durch entsprechendes Drehen und Schwenken in die optimale Position zum einfallenden Licht gebracht werden. Unter dem Stereomikroskop (16-fache Vergrößerung) wird zuerst die indifferente Elektrode schräg durch den unteren Teil des Kopfes gestochen. Die Ableitelektrode (elektrolytgefüllte Glasmikroelektrode) wird möglichst senkrecht zur Corneaoberfläche einjustiert und behutsam durch Drehen der Mikrometerschraube dicht unter die Corneaoberfläche eingestochen. Durch Lichtreizung wird die Funktionsfähigkeit von Photozelle, Heuschreckenauge und Ableitvorrichtung geprüft; der Faradaykäfig wird zur Abschirmung von Störsignalen und Fremdlicht über die Apparatur geklappt.

3.4 Reaktions-Intensitäts-Kennlinie

3.4.1 Durchführung

Das dunkeladaptierte Heuschreckenauge wird mit Lichtreizen (0,5 s) verschiedener Intensität gereizt. Um hohe max. Lichtintensitäten zu erreichen, wird bei folgenden Versuchen der Lichtstrahl mit einer Linse auf das Auge fokussiert. Zwischen zwei aufeinanderfolgenden Reizen sollte mindestens die Zeit von 1 Minute liegen, um Adaptationseffekte gering zu halten.

Folgende Graufilter stehen zur Verfügung:

Fl : T = 3,3 x 10^{-1} = 33%
F2: T = 10^{-1} = 10%
F3: T = 10^{-2} = 1%
F4: T = 10^{-3} = 0,1%

(T = Transmission; Bsp.: T = 10^{-1} bedeutet: 90% des Lichtes werden absorbiert, 10% passieren den Filter. max. Lichtintensität = 100%)

Die Reizung beginnt mit dem Licht geringster Intensität. Die Intensität wird stufenweise erhöht *(*10^{-5}*,* 10^{-4}, 10^{-3}.... bis max. Intensität). Bei Mitbenutzung von Fl = 33% sind Zwischenwerte möglich. Bitte im Dunkeln messen!

3.4.2 Auswertung

Die ERG-Potentiale werden für die verschiedenen Lichtintensitäten jeweils auf dem Monitor des PC dargestellt und können mit Hilfe der Zoom-Ansicht der verwendeten Software genau vermessen werden. Die Daten werden notiert und in der Gruppe diskutiert. Außerdem werden die erhaltenen Graphiken in Powerpoint©-Folien integriert und auf dem mitzubringenden USB-Stick gespeichert. Die Ableitungen sind für das Protokoll ausführlich zu beschriften und im Ergebnisteil zu präsentieren (zusammen mit erklärenden Texten *und* Bildunterschriften!!!). (Beschriftung enthält mindestens: Lichtintensität in % des Maximalreizes, Belichtungszeit, Vorverstärker-Einstellung, Achsenbeschriftungen).

Die Amplituden der Rezeptor-Summenpotentiale sind in einer halblogarithmischen Darstellung gegen die Lichtintensität aufzutragen. Y-Achse (linear): ERG-Amplitude in mV; X-Achse (log): Reizintensität in % des Maximalreizes.

Da wir in zwei Gruppen zu je drei Studentinnen arbeiten, ergeben sich also zwei Versuchsreihen mit zwei Kennlinien. Diese dürfen auf keinen Fall gemittelt werden,

sondern sind als getrennte Ergebnisse zu zeigen. Eventuelle Unterschiede müssen natürlich diskutiert werden.

3.5 Bestimmung der Verschmelzungsfrequenz bei verschiedenen Lichtintensitäten

3.5.1 Durchführung

Zu diesem Versuch wird eine in ihrer Flickerfrequenz regelbare Stroboskoplampe mit extrem kurzen Lichtblitzen benutzt. Alle Messungen werden im Dunkeln durchgeführt.

Verschmelzungsfrequenz des Menschen:

Die Lampe wird auf eine helle neutrale Fläche gerichtet (Abstand ca. 30 cm) und die Verschmelzungsfrequenz sowohl bei max. Intensität als auch bei 10% bzw. 1% (Filter 2 und 3) bestimmt.

Verschmelzungsfrequenz der Heuschrecke:

Die Stroboskoplampe wird vor die Ableitapparatur gestellt und das Flickerlicht direkt auf das Auge gerichtet. Ansonsten verläuft dieser Versuch wie Versuch 1. Getestet werden steigende Flickerfrequenzen bis die Flimmerverschmelzungsfrequenz des Heuschreckenauges erreicht ist. Der Versuch wird für drei Intensitäten (100%, 10%, 1%) durchgeführt. Die Flickerfrequenz der Stroboskoplampe ergibt sich aus der Anzahl der Lichtblitze pro 0.5 s (am Monitor ablesbar), wobei die Flickerverschmelzungsfrequenz an der veränderten Form des ERGs erkennbar ist (wie sollte dieses aussehen für trennbare bzw. nicht trennbare Flicker-Reize?)

3.5.2 Auswertung

Wie verändert sich der Potentialverlauf des ERGs mit steigender Flickerfrequenz? Welchen Einfluss hat die Lichtintensität auf die Flickerverschmelzungsfrequenz?

Aussagekräftige Ableitungen (Verlauf der Änderung der ERG-Form), sowie die erhaltenen Daten für alle getesteten Frequenzen (Tabelle) sind im Ergebnisteil zu zeigen, zu beschriften und im Ergebnistext zu beschreiben.

4. Versuch B: Hörphysiologie

4.1 Bestimmung der unteren Hörschwelle beim Menschen (Audiometer)

4.1.1 Durchführung

Die von einem Schwingungssummer erzeugten Töne, deren Frequenz und Schalldruck einstellbar sind, werden einer Versuchsperson (VP) in einem schalltoten Raum über einen Kopfhörer (jeweils ein Ohr) vorgespielt. Es soll festgestellt werden, bei welchem Schalldruck der jeweilige Ton in Abhängigkeit von der eingestellten Frequenz für die VP gerade hörbar wird.

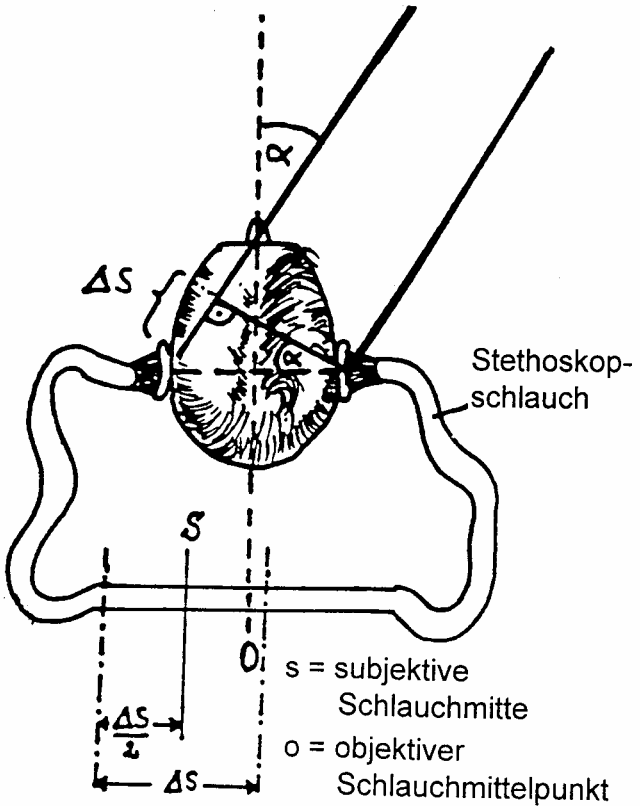
4.1.2 Auswertung

Die Werte werden in eine vorgedruckte Diagrammkarte eingetragen. In diesem Vordruck ist die normale Hörschwelle als gerade Linie dargestellt, die mit "'0 dB" bezeichnet wird. (vgl. Schmidt/Thews dort ist ein Audiogramm abgedruckt).

4.2 Bestimmung der Zeitdifferenzschwelle des Hörens beim Menschen

Über Laufzeitdifferenz und Intensitätsdifferenz des Schalls zwischen beiden Ohren wird das Richtungshören ermöglicht. Schallwellen aus der Richtung α erreichen das rechte Ohr früher als das linke. Bei konstanter Schallgeschwindigkeit und bekanntem Ohrenabstand entspricht der Strecke Δs ein bestimmtes Δt, das als Laufzeitdifferenz bezeichnet wird.

4.2.1 Durchführung



Die VP steckt sich die beiden Oliven eines Stethoskops, die durch einen Gummischlauch verbunden sind, in die Ohren. Der Betreuer klopft mit einem Bleistift in zufälligem rechts-links Wechsel langsam von außen nach innen gehend auf den Schlauch und stellt die Punkte fest, bei denen die VP gerade noch angeben kann, ob rechts oder links geklopft wurde. Die beiden Grenzpunkte werden markiert. Da beide Ohren in der Regel nicht gleich empfindlich sind (unterschiedliche Intensitäts-schwelle), fällt die subjektive Mitte nicht mit der geometrischen Schlauchmitte zusammen.

4.2.2. Auswertung

Bestimme die subjektive Mitte (s) als Mittelpunkt der Strecke Δs und deren Abweichung vom Schlauchmittelpunkt (o). Aus der Strecke (Δs) zwischen den beiden Grenzpunkten soll der scheinbare Hörwinkel (α) ermittelt werden, bei dem gerade noch eine rechts-links Unterscheidung möglich ist (hierbei kann als Ohrenabstand 18 cm angenommen werden).

Aus der Strecke (Δs) wird die für die rechts-links Unterscheidung notwendige Laufzeit (Zeitdifferenzschwelle) errechnet (Schallgeschwindigkeit in Luft 330 m/s).

5. Erfolgskontrolle:

Nach diesem Praktikumsteil sollten Sie in der Lage sein

- zu beschreiben, welche Eigenschaften das Rezeptorpotential kennzeichnen und wie es sich vom Aktionspotential unterscheidet.
- die Beziehung zwischen Reiz, Rezeptorpotential und Impulsfolgefrequenz wiederzugeben.
- die Unterschiede in Aufbau und Funktion von Komplexaugen der Insekten und Wirbeltierauge zu erläutern.
- die morphologischen und physiologischen Unterschiede der verschiedenen Komplexaugentypen zu erklären.

- zu erläutern, was man unter der Kennlinie eines Rezeptors versteht und einige verschiedene Kennlinienverläufe anzugeben.
- das ungefähre zeitliche Auflösungsvermögen von menschlichem Auge und Insektenauge zu nennen und anzugeben, wie es sich bei geringerer/größerer Beleuchtungsstärke verhält.
- die Anatomie des menschlichen Auges und Ohres darzustellen und ihre Funktion zu erläutern.
- die Begriffe Schalldruck, Schalldruckpegel (dB) und Lautstärkepegel (phon) anwenden zu können.
- zu erklären, wie man eine Hörschwellenkurve aufnimmt, und welchen Verlauf sie beim Menschen im Bereich von 16 - 20 000 Hz hat.
- die Begriffe subjektive Mitte und Zeitdifferenzschwelle erläutern zu können.
- die Grundlagen des Richtungshörens zu erklären.

Kurs I: Lernmechanismen

"Mr. Osborne, may I be excused? My brain is full."

1 Einleitung

Lernen ist die Fähigkeit, Verhalten aufgrund individueller Erfahrung so zu ändern, dass es veränderten Situationen besser angepasst ist.
Ein klassischer Lernvorgang setzt sich folglich zumindest aus 4 verschiedenen Komponenten zusammen. Zuerst muss Information über die Umwelt (1) aufgenommen und (2) gespeichert werden. Dann kann diese Information (3) abgerufen werden und (4) zu einem entsprechenden Verhalten führen.
Stammesgeschichtlich gesehen stellt die Fähigkeit zu Lernen eine Anpassung dar, die es einem Organismus erlaubt, sich optimal an eine sich verändernde Umgebung anzupassen, indem er, über ererbte Verhaltensmuster hinaus, sein Verhalten entsprechend steuern kann. Dies wird besonders deutlich, wenn wir ontogenetische Phasen betrachten, die eigens dafür vorgesehen sind, dem Tier oder dem Menschen ein intensives Erlernen seiner Umwelt zu erlauben. Beispiele hierfür sind Geruchs- und Sprachlernen bei Säuglingen und Kleinkindern.
Lernvorgänge lassen sich in verschiedene Kategorien einteilen, deren Übergänge aber (wie häufig in der Biologie) fließend sind. An diesem Kurstag führen Sie Experimente zu zwei Lernformen, der klassischen und operanten Konditionierung durch.

2 Formen des Lernens

Die Untersuchung biologischer Lernformen war lange Zeit beherrscht von der aus den USA stammenden experimentellen Psychologie. Diese hatte zum Ziel aus tierexperimentellen Befunden allgemeine, auch für den Menschen geltende Gesetzmäßigkeiten des Lernens aufzustellen. Im Mittelpunkt standen dabei wenige Versuchstiere, hauptsächlich Ratten, die meist in standardisierten Laborsituationen untersucht wurden (Skinner Box).

Obwohl damit weder der Vielfalt natürlicher Lebenssituationen Rechnung getragen wird, noch evolutiv bedingte artspezifische Besonderheiten berücksichtigt wurden, haben sich

die lernpsychologischen Begriffssysteme, z.T. wegen einem Fehlen besserer Klassifikationsgrundlagen auch in der Biologie weitgehend durchgesetzt.

2.1 Nicht assoziatives Lernen

Hierzu gehören ***Habituation, Dishabituation*** und ***Sensitisierung***. Bei diesen Lernformen verlieren bereits existierende Verknüpfungen entweder Ihre Wirkung oder sie werden verstärkt. Es findet also keine neue Bedeutungsverknüpfung zwischen verschiedenen Reizen oder zwischen Reizen und Reaktionen statt. Solche einfachen Lernformen findet man im gesamten Tierreich.

Habituation, Dishabituation

Unter Habituation - auch als Gewöhnung oder reizspezifische Ermüdung bezeichnet - versteht man die Fähigkeit eines Individuums, auf wiederholt auftretende Reize, die nicht mit irgendwelchen Folgen verbunden sind, nicht mehr zu reagieren. Durch Versuche ließ sich zeigen, dass hierbei nicht eine Ermüdung im ausführenden Organ vorliegt. Die ausbleibende Reaktion lässt sich durch einen andersartigen Reiz wieder in ihrer vollen Intensität auslösen. Nach Darbietung eines andersartigen Reizes oder nach einer längeren Pause löst auch der zuerst gebotene Reiz die Reaktion wieder aus - man spricht von einer Dishabituation.

Sensitisierung

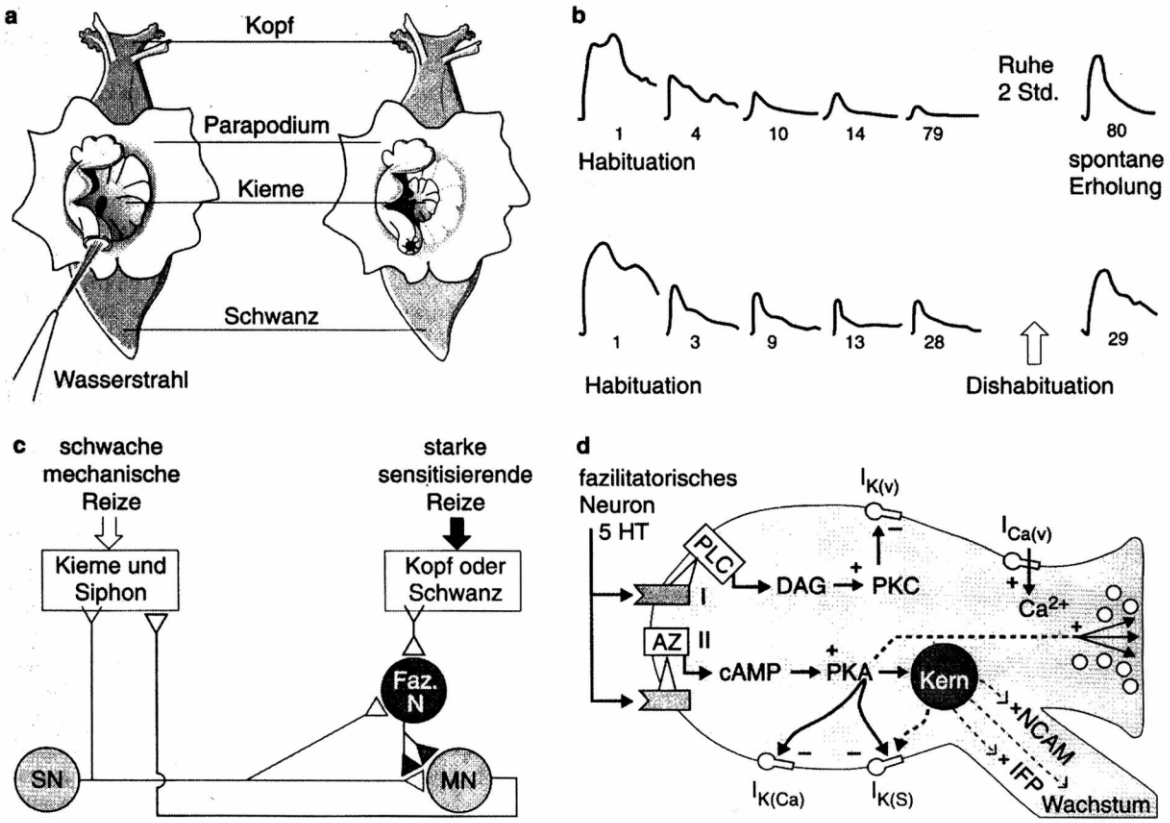
Bei der Sensitisierung oder Empfindlichkeitssteigerung findet eine Reaktionsverstärkung auf viele Reize nach einem besonders intensiven oder schädlichen Reiz statt. Dabei wird der Verhaltenskontext von der Art des Stimulus bestimmt.

Langzeit-Habituation/Sensitisierung

Die oben angeführten Kurzzeitformen von Habituation und Sensitisierung sind durch Erholungsphasen von Minuten bis Stunden und einer Änderung der Transmitterausschüttung an den Synapsen gekennzeichnet. Neben diesen Kurzzeitformen gibt es auch Langzeitformen. Die Erholungsphase bei Langzeit-Habituation/Sensitisierung kann Tage bis Wochen dauern, es kann eine Änderung in der Anzahl funktioneller Synapsen auftreten und es ist Genaktivität involviert.

Kasten 1

Eine marine Nacktschnecke (*Aplysia californica*) dient als Modellsystem für die neuronalen Grundlagen nicht assoziativer Lernvorgänge.



Heterosynaptische Bahnung des Kiemen- und Siphon-Rückziehreflexes der Meeresschnecke *Aplysia californica*. **a** Werden die Kiemen mechanisch gereizt (z.B. mit einem Wasserstrahl), kontrahieren sie sich reflexartig. **b** Wiederholte Reizung führt zur Habituation der Kontraktionsstärke. Die Kontraktion ist um so stärker, je höher die Registrierspur ist. Unter jeder Registrierung steht die Zahl der aufeinanderfolgenden Reize. Unterbricht man die Reizung, erholt sich der Reflex. Der Pfeil gibt einen starken, dishabituierenden Reiz am Kopf oder Schwanz an. **c** Schaltbild der monosynaptischen Komponente des Reflexkreises. SN repräsentiert eine größere Zahl mechanosensorischer Neurone; MN einige Motoneurone, die die Muskel in den Kiemen versorgen; faz. N. ist ein identifiziertes fazilitierendes Neuron, das durch einen starken Reiz erregt wird und dessen Aktivität im Verhalten zur Sensitisierung führt. **d** Schema der intrazellulären Reaktionswege bei der heterosynaptischen Fazilitation des mechanosensorischen Neurons SN von *Aplysia*. 5-HT: Serotonin, der modulatorische Transmitter, der von dem fazilitatorischen Neuron ausgeschüttet wird. I: Serotonin-Rezeptor Typ I, der durch Cryptoheptidine blockiert wird, II: Serotonin-Rezeptor Typ II, der durch Cryptoheptidine nicht blockiert wird, PLC: Phospholipase C, AZ: Adenylatzyklase, DAG: Diacylglycerol, PKC: Proteinkinase C, PKA: Proteinkinase A, IFP: intermediates Filamentprotein, NCAM: neuronales Zelladhäsionsmolekül. Positive (+) und negative (-) Zeichen geben eine Zunahme oder Abnahme der Ionenleitfähigkeiten und anderer zellulärer Prozesse an (aus Menzel (1996), siehe 3.1).

2.2 Assoziatives Lernen

Hierzu gehören die ***klassische*** und die ***operante Konditionierung***. Beim assoziativen Lernen wird eine Assoziation zwischen einem Reiz und einer Reaktion geschaffen. Assoziationen können sehr lange andauern.

Klassische Konditionierung

Unter der klassischen (auch Pawlow'schen) Konditionierung versteht man die Auslösung eines Reflexes oder einer Verhaltensweise durch einen anderen als den „normalen" Reiz. Bei dieser Lernform wird ein ursprünglich neutraler Reiz (***CS = konditionierter Stimulus oder bedingter Reiz***), der beim naiven Tier keine Reaktion auslöst, im Zentralnervensystem mit einem reaktionsauslösenden Reiz (***US = unkonditionierter Stimulus oder unbedingter Reiz***) so verknüpft, dass auch er eine Reaktion auslöst. Wichtig bei dieser Lernform ist die zeitliche Beziehung zwischen dem unbedingten und dem bedingten Reiz (Prinzip der ***Kontiguität***). Ein anderer Begriff, ***Kontingenz***, beschreibt die Zuverlässigkeit, mit der der US dem CS folgt. Je höher die Kontingenz zwischen CS und US ist, umso höher ist die prädiktive Stärke des CS.

Das klassische Beispiel sind die Versuche, die der Physiologe Pawlow mit Hunden durchführte (1921, siehe Kasten 2): Wird einem hungrigen Hund Fleischpulver (US) in den Mund geblasen, so reagiert das Tier mit Speichelsekretion (***UR = unkonditionierte*** oder ***unbedingte Reaktion***). Dies ist ein einfacher Reflex. Bietet man dem Hund gleichzeitig mit dem Futter einen zweiten, neutralen Reiz, einen Klingelton (CS), so löst nach einigen Wiederholungen (***Akquisitionsphase***) auch dieser Reiz alleine den Speichelfluss aus. Diese Reaktion wird nun ***konditionierte*** oder ***bedingte Reaktion*** genannt (***CR***).

In Pawlow's Versuchen verschwand die CR nach einiger Zeit, wenn nur der CS gegeben wurde. Diese ***Extinktion*** ist ein eigener Lernvorgang, der die vorhergehende Assoziation nicht löscht. Wird nämlich der gleiche Reiz erneut konditioniert, dann stellt sich die konditionierte Reaktion sehr viel schneller ein, als bei der ersten Konditionierung. Bei der Extinktion nimmt die Prädiktionsstärke des CS ab, sowie sie in der Akquisitionsphase zugenommen hat.

Operante Konditionierung

Im Gegensatz zur klassischen Konditionierung, bei der eine bereits vorhandene Reaktion mit einem neuen Reiz verknüpft wird, wird bei der operanten Konditionierung eine neue Reaktion mit einer bestimmten Reizsituation in Zusammenhang gebracht. Vorraussetzung ist eine aktive Beteiligung des Tieres, das zunächst spontan eine gegebene Situation erforscht. Erweist sich eine bestimmte Verhaltensweise als erfolgreich (führt z.B. zu einer Belohnung), so wird die damit verbundene Reizsituation gelernt. Diese Lernform wird oft auch als „Lernen durch Versuch und Irrtum“ oder als instrumentelles Lernen bezeichnet. Mit Instrument wird hier das Verhalten gleichgesetzt.

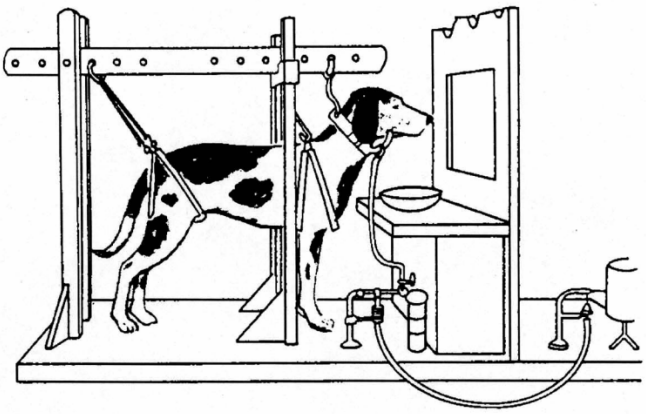
Der zeitliche Verlauf der Konditionierung wird in einer Lernkurve, in der die Zahl der „richtigen“ Aktionen pro Zeiteinheit (Aktionsrate), bzw. die Zahl der Fehler pro Durchlauf aufgetragen werden, dargestellt. Die Phase der Verknüpfung zwischen Aktion und Belohnung wird ***„Lernphase“*** genannt. Darunter versteht man den Teil der Lernkurve, in dem die Aktionsrate kontinuierlich steigt. Ist die Assoziation zwischen Reiz und Aktion etabliert, spricht man von der ***„Kannphase“***. Sie ist gekennzeichnet durch eine weitgehend konstante Aktionsrate.

Der Zeitverlauf der Lernkurve kann durch eine große Zahl von Parametern verändert werden, z.B. durch unterschiedliche Zeitbeziehung zwischen Reiz und Belohnung, besonders aber durch Veränderungen in der Verstärkungsrate. Wird jede Aktion verstärkt, spricht man von ***kontinuierlicher*** oder ***Immerverstärkung,*** wird nur ein Teil der Aktionen belohnt, spricht man von ***diskontinuierlicher Verstärkung*** (z.B. jedes 2. Mal, alle 2 Min.). Der Lernerfolg ist am größten bei unregelmäßiger Verstärkung.

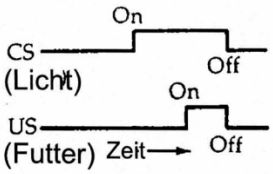
Kasten 2

Pawlowsche Konditionierung

A



B Konditionierung



C Vor der Konditionierung

CS (Licht) → Keine Antwort oder nicht relevante Antwort

US (Futter) → UR (Speichelsekretion)

Während der Konditionierung

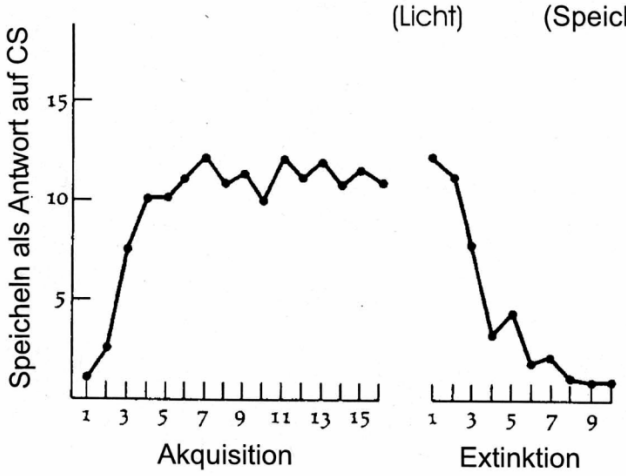
CS (Licht)

US (Futter) → UR (Speichelsekretion)

Nach der Konditionierung

CS (Licht) → CR (Speichelsekretion)

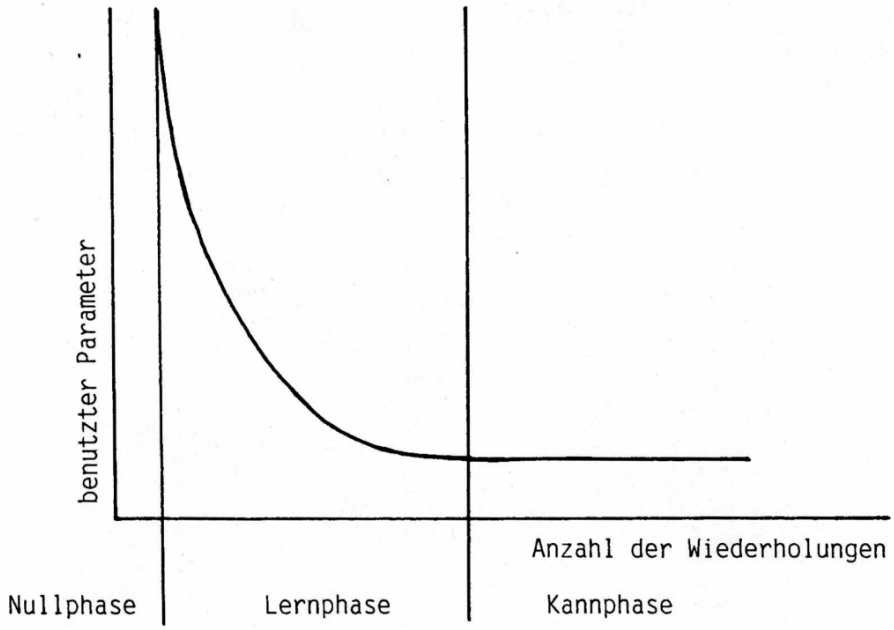
D



A) Versuchsaufbau **B)** Bei der Konditionierung wird der CS (Licht) kurz for dem US (Futter) gegeben. **C)** Vor der Konditionierung löst nur der US Speichelsekretion (UR) aus. Nach wiederholten Paarungen von CS und US löst auch der CS alleine Speichelsekretion aus (CR). Eine Assoziation zwischen CS und US hat stattgefunden. **D)** zeigt, daß die konditionierte Speichelsekretion (CR) schnell gelernt (Akquisition), aber auch schnell wieder verlernt wird (Extinktion).Verändert nach Thompson (1993).

Kasten 3

Idealisierte Lernkurve



Eine Lernkurve stellt die Abhängigkeit des Lernerfolges von der Anzahl der Wiederholungen der Lernsituation dar. Es können verschiedene Parameter zur Auftragung benutzt werden; z.B. benötigte Zeit, Anzahl der Fehler, Latenzen, etc.

2.3 Höhere Formen assoziativen Lernens

Diesen Formen des Lernens ist gemeinsam, dass die Antriebe und bewertenden Ereignisse nicht äußere Stimuli, sondern innere Zustände sind (z.B. Erwartung, Neugierde). Hierher gehören Lernformen wie latentes Lernen (z.B. Orientierungslernen und spielendes Lernen), beobachtendes Lernen und Nachahmungslernen.

Latentes Lernen

Eine Lernform, bei der Assoziationen weder an Belohnung noch an Bestrafung gekoppelt sind. Auch ist kein konkretes Verhalten während des Lernprozesses auszumachen.

Spielendes Lernen ist bei Primaten wichtig für die Entwicklung sozialen Verhaltens. Die soziale Kompetenz, die im Spiel als Jungtier gelernt wird, manifestiert sich erst im Erwachsenenalter.

Beim **Orientierungslernen** oder **räumlichen Lernen** erlernen Tiere Merkmale ihrer Umgebung um sich in dieser zurechtzufinden.

Beobachtendes Lernen

Bei dieser Lernform wird durch Beobachten des Verhaltens eines anderen Tieres gelernt. In einer ähnlichen Situation kann dann ein entsprechendes Verhalten ausgeführt werden.

Nachahmungslernen

Diese Lernform tritt auf, wenn ein Tier sofort die Aktion eines anderen Tieres in dessen Gegenwart imitiert. Ein gut untersuchtes Beispiel ist das Gesangslernen der Vögel. Beim Menschen hat diese Lernform für die Entwicklung menschlicher Gesellschaften große Bedeutung.

2.4 Höhere Lernleistungen

Einsichtiges Lernen

Von einigen Wirbeltieren, insbesondere Primaten sind Lernleistungen bekannt, bei denen das Tier eine raum-zeitliche Handlungsfolge nicht operant erlernt, sondern “in Gedanken” planend durchspielt und anschließend zielstrebig durchführt. Diese Lernform wird gegenüber dem assoziativen Lernen als einsichtiges Lernen abgegrenzt. Kennzeichnend für „Lernen durch Einsicht“ ist die weitgehende Inaktivität während der Lernphase. Deutlich sichtbar wird nur die Kannphase. Die Unterscheidung ob *assoziatives Lernen* durch Versuch und Irrtum, oder *einsichtiges Lernen* vorliegt, ist sehr schwer, im Einzelfall vielleicht gar nicht möglich.

Explizites und implizites Lernen

Beim Menschen unterscheidet man zwei Lernkategorien:

1) Beim **expliziten Lernen** (= **deklaratives Lernen**) werden Informationen über die Welt, Personen, Orte und Dinge schnell in einer bildhaften Weise gespeichert. Derart Erlerntes ist in Form des **deklarativen Gedächtnisses** ständig im Bewusstsein verfügbar.

2) Beim **impliziten Lernen** (= **prozedurales Lernen**) werden Informationen darüber gespeichert, wie etwas zu tun ist. Dabei handelt es sich um motorische Fähigkeiten und einfache Wahrnehmungsleistungen, die weitgehend automatisch gespeichert werden (**prozedurales Gedächtnis**).

2.5 Prägung

Prägung ist ein Lernvorgang, der in den verschiedensten Funktionskreisen auftreten kann. Er ist gekennzeichnet durch eine *sensible Phase* (nur in dieser Zeit kann gelernt werden), und durch eine weitgehende *Irreversibilität* des Lernresultates.

3 Grundkenntnisse

Beschreibung unterschiedlicher Lernformen mit Beispielen. Prinzip der Kontiguität, Kontingenz. Primäre und sekundäre Verstärkung. Lernkurve, Lern- und Kannphase. Kurzzeit-, Langzeitgedächtnis. Verstärkungsprinzipien. Beispiele der Ermüdung, Reifung. Transferlernen.

3.1 Literatur zur Vorbereitung

[1]Buchholz C (1979) Unterricht der Biologie, Heft 33, 3. Jahrgang.

[1]Cruse H (1976) Biologie in unserer Zeit 6: 183-185. Beschreibung des Labyrinthversuchs.

[2]Menzel R (2001) Neuronale Plastizität, Lernen und Gedächtnis. In Neurowissenschaft; 2. Auflage; Eds Dudel J, Menzel R, Schmidt D; Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York; pp 485-518

[1] steht zum Download auf der Tierphysiologie Webseite.

[2] oder 1. Auflage, zu finden in der Fachbereichsbibliothek Biologie.

3.2 Weiterführende Literatur

Carew TJ (2000) Behavioral Neurobiology. The Cellular Organization of natural behaviour. Sinauer Associates Inc.

Drickamer LC, Vessey SH, Meikle D (1996) Learning Behavior. In: Animal Behavior, 4th edition; WM. C. Brown Publishers; pp 187-213

Kim JJ and Thompson RF (1997) Cerebellar circuits and synaptic mechanisms involved in classical eyeblink conditioning. TINS 20:177-188.

McFarland D. (1989) Biologie des Verhaltens: Evolution, Physiologie, Psychobiologie. VCH Weinheim, pp 281-323.

Menzel R. (1982) Neurophysiologie einfacher Lernvorgänge. Naturwiss. Rdschau 35: 61-69.

Thompson RF (1993) The brain: A neuroscience primer. 2nd ed. Eds Atkinson RC, Lindzey G and Thompson RF. Freeman WH and Company.

4 VERSUCH A: Klassische Konditionierung des Lidschlagreflexes

Der Lidschlagreflex, der auf eine Reizung des Auges durch einen Luftstrom erfolgt („unbedingter Reiz“ oder „unconditioned stimulus“, US), kann an einen bedingten Reiz („conditioned stimulus“, CS) gekoppelt werden. Als CS wird in diesem Versuch ein akustischer Reiz verwendet.

4.1 Durchführung

Es wird mit einem Gummiball ein leichter Luftstrom erzeugt, der mit einem Schlauch auf das offene Auge einer Versuchsperson gerichtet wird. Der Experimentator, der den

Luftstrom erzeugt, sollte schräg hinter der Versuchsperson sitzen, damit diese ihn nicht sehen kann.
Der US (Luftstrom) wird in unregelmäßigen Abständen (Mittel ca. 2-3 Sekunden) gegeben. Etwa gleichzeitig mit dem Luftstrom (Prinzip der Kontiguität!) wird kurz der CS (Klickgeräusch) gegeben. Die besten Lernerfolge werden erzielt, wenn der CS kurz (0,2 - 0,8 Sek.) vor dem US einsetzt. Nach einer gewissen Lernphase sollte der Lidschlagreflex durch das Klickgeräusch auslösbar sein.
Jeder Kursteilnehmer soll einmal Versuchsperson und Experimentator sein. Vorsicht bei Personen mit empfindlichen Bindehäuten und Kontaktlinsenträgern!

4.2 Auswertung

Protokollieren Sie, wie schnell sich bei den einzelnen Versuchspersonen die CR einstellt. Stellen sie den Zeitverlauf der Extinktion fest. Versuchen Sie, die Umkehrbarkeit der Extinktion nachzuweisen.

5 VERSUCH B:

5.1 Operante Konditionierung - Handlabyrinth

Bei Labyrinthversuchen in der operanten Konditionierung verwendet man entweder Hoch- oder Tieflabyrinthe. Der Schwierigkeitsgrad reicht von einfachen Y-Labyrinthen bis zu hoch komplexen Labyrinthen, die auch dreidimensional angelegt sein können. Bei diesem Versuch kommen zweidimensionale Tieflabyrinthe zum Einsatz. Am auf dem Tisch liegenden Labyrinth soll die Versuchsperson mit verbundenen Augen den richtigen Durchgang mit einem Stift erlernen.

5.1.1 Durchführung

Es werden folgende Lernhilfen gegeben:

- kurze Erfahrung über Gangtiefe und Gangwinkel, ebenfalls über die Gangbreite
- kurzes Abtasten der Labyrinthgröße
- Eine rechtshändige Versuchsperson darf mit der linken Hand während der Versuche die untere linke Labyrinthecke anfassen und umgekehrt. (Bezugssystem!)
- Immer wenn die Versuchsperson den Stift zum Startloch zurückführt, wird ihr dies mitgeteilt.
- Das Erreichen des Ziels wird mitgeteilt.

Protokolliert werden die Anzahl und Art der Fehler und die Zeit, die für einen Durchgang vom Start bis zum Ziel benötigt wird.

Um das Phänomen des ***Transfer-Lernens*** zu untersuchen, werden zwei Gruppen von Versuchspersonen gebildet. Die erste bekommt das Labyrinth nicht zu sehen. Sobald sich bei einer Versuchsperson eine relativ stabile Kannphase ausgebildet hat, wird ihr das Labyrinth spiegelbildlich angeboten. Den Versuchspersonen der zweiten Gruppe wird Gelegenheit gegeben, vor dem Versuch das Labyrinth ca. 5 Minuten lang zu betrachten.

5.1.2 Auswertung

Stellen Sie den Lernverlauf graphisch dar und vergleichen sie ihre Lernkurven. Testen Sie, ob bei der spiegelbildlichen Präsentation des Labyrinths ein Transfer der vorherigen Lernerfahrung stattfindet, d.h. ob eine Verkürzung der Lernphase eintritt.
Testen Sie, ob ein vorangehendes optisches Kennenlernen des Labyrinths ähnlich transferiert wird.
Diskutieren Sie, welche Verstärker bei diesen Experimenten wirken.

5.2 Operante Konditionierung – „Cup stacking“ (motorisches Lernen)

Beim motorischen Lernen geht es um das Erlernen eines Bewegungsablaufes, den man nach mehrmaliger Wiederholung immer besser bzw. schneller beherrscht (z.B. Klavierspielen). Wichtig hierbei ist, dass dieser Prozess (idealerweise) unabhängig vom bewussten Nachdenken über den Lernablauf erfolgt. Bei diesem Versuch sollen so schnell wie möglich zwei Becherpyramiden aus jeweils sechs Bechern aufgestapelt und wieder zusammengesteckt werden.

5.2.1 Durchführung

Als Lernhilfe wird der Versuchsperson kurz erklärt, auf welche Weise sich optimal eine Pyramide aus sechs Bechern stapeln lässt. Daran anschließend erhält die Versuchsperson einmal die Möglichkeit, diesen Bewegungsablauf langsam durchzuführen.
Ein Durchgang beginnt mit zwei Becherstapeln von je sechs Bechern, die vor der Versuchsperson stehen. Diese hat ihre Handflächen auf dem Tisch liegen. Auf das Startkommando hin werden nacheinander beide Becherpyramiden aufgestellt und in der gleichen Reihenfolge zusammen geschoben. Die Hände werden danach wieder auf den Tisch gelegt. Protokolliert wird die Zeit eines Durchganges, zwischen Hände abheben und Hände wieder ablegen. Es werden so viele Durchgänge gemacht, bis sich eine stabile Zeit (Kannphase) einstellt.

5.2.2 Auswertung

Stellen Sie den Lernverlauf graphisch dar und vergleichen Sie ihre Lernkurven. Diskutieren Sie, welche Verstärker bei diesem Experiment wirken.
Im Kurs stehen Rechner zur Dateneingabe zur Verfügung. Für den Datentransfer sollte pro Gruppe ein USB Stick mitgebracht werden.

KURS K: CHRONOBIOLOGIE

1. Einleitung

Im Tag/Nacht-Rhythmus ist das Verhalten von Menschen, genauso wie das von Tieren, charakterisiert durch einen präzisen 24-Stunden Rhythmus von Ruhe und Aktivität, Schlaf und Wachzustand. Dieser **circadiane Rhythmus** ist eine fundamentale Anpassung der Organismen auf der Erde an einen überwältigenden Umweltreiz: den 24-stündigen Licht-Dunkelwechsel der auf- und untergehenden Sonne. Circadiane Rhythmen wurden in Ein- und Vielzellern, in allen untersuchten Pflanzen und Tieren gefunden. Sie orchestrieren die Zeitstruktur aller physiologischen Prozesse in einem Organismus und bieten offensichtliche Selektionsvorteile.

2. Grundkenntnisse

Circadiane Rhythmen haben Folgendes gemeinsam:
1. unter konstanten Umweltbedingungen (DD= Dauerdunkel, oder LL= Dauerlicht, und konstanter Temperatur) zeigen sie einen **freilaufenden, endogenen Rhythmus** mit einer **Periodenlänge τ (Tau)** von **etwa 24 Stunden,** der **temperaturkompensiert** ist**.**
2. im normalen 24-stündigen Licht-Dunkelrhythmus eines Tages (LD) wird dieser endogene Rhythmus auf exakt 24 Stunden **synchronisiert.**

Welchen **Evolutionsvorteil** bieten circadiane Rhythmen?
1. Tagesperiodische Änderungen können antizipiert werden (die Empfindlichkeit unserer Augen verändert sich noch ehe es Tag wird).
2. Miteinander inkompatible biochemische Prozesse in einer Zelle können zeitlich getrennt werden (z.B. Photosynthese versus Stickstofffixierung in Cyanobakterien: Nitrogenase wird durch Sauerstoff inaktiviert).
3. Alle physiologischen Prozesse in einem Organismus werden zeitlich aufeinander abgestimmt und mit dem Tag/Nacht-Rhythmus der Umwelt synchronisiert.

4. Bestimmte physiologische Prozesse eines Organismus können auf eine dafür günstige Tageszeit verlegt werden (Fliegen schlüpfen am frühen Morgen, wenn es noch nicht so heiß und trocken ist).
5. Es kann Zeit gemessen werden.

Circadiane Rhythmen sind **genetisch determiniert**, das heißt, dass die freilaufende Periodenlänge verschiedener Individuen einer Art wenig Variation zeigt. Beim **Menschen** beträgt die **endogene Periodenlänge verschiedenster physiologischer Parameter 24,18 Stunden** in allen Altersgruppen und wird vom **Suprachiasmatischen Nucleus (SCN)** gesteuert. Der SCN liegt im anterioren, ventralen Hypothalamus, neben dem 3. Ventrikel, über der optischen Sehbahn. Er erhält photische Eingänge vom retinohypothalamischen Trakt (RHT) und vom geniculohypothalamischen Tract (GHT). Nur der RHT ist für die Lichtsynchronisation unerläßlich. Einzelne Neurone des SCN sind endogene Oszillatoren, die am Tag hohe und in der Nacht niedrige Spontanaktivität (=spontanes Feuern von Aktionspotentialen) aufweisen.

Am meisten ist über die Entstehung endogener Oszillationen von Schrittmacherneuronen bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* bekannt. Dort wurden verschiedene Mutanten isoliert, die gestörte circadiane Aktivitätsrhythmen aufweisen. Vor allem zwei Gene, *per* und *tim* (per = period, tim = timeless Gene), die auch bei Säugern gefunden wurden, koppeln negativ auf ihre eigene Transkription zurück, so dass circadiane Schwankungen in deren mRNA und Proteinmenge entstehen. Wie dieser "feedback-loop" im Zellkern zu circadianen Schwankungen in der Spontanaktivität der Schrittmacherneuronen führt, ist weitgehend unbekannt. Bei Insekten, ebenso wie bei Säugern gibt es nicht nur einen circadianen Schrittmacher, sondern **sehr viele verteilte Uhren**, die **untereinander synchronisiert** werden. Das heißt, der PER/TIM-*feedback loop* findet sich in sehr vielen Zellen des Körpers. Aber man weiß von verschiedenen Insekten, dass das Schrittmacherzentrum, das die Laufaktivität der Tiere kontrolliert, in peptidergen Neuronen im Gehirn der Tiere liegt. Diese peptidergen Neuronen enthalten das **Neuropeptid *pigment-dispersing factor*** (**PDF**). Bei *Drosophila*, ebenso wie bei der Schabe *Leucophaea maderae* innervieren diese PDH-enthaltenden Neurone die akzessorische Medulla, ein kleines Neuropil zwischen Medulla und Lobula in den optischen Loben des Gehirns. Diese akzessorische Medulla ist offensichtlich das

Hauptschrittmacherzentrum von Schaben und wahrscheinlich auch von anderen Insekten.

Circadiane Begriffe:

Periodenlänge (τ) Die Zeit, nach der eine bestimmte Phase der Schwingung wiederkehrt, z.B. vom Beginn der Laufaktivität am ersten Tag bis zum Beginn der Laufaktivität am zweiten Tag.

Frequenz Kehrwert der Periodenlänge = $1/\tau$

Amplitude Differenz zwischen Schwingungsgleichwert und Maximum der Auslenkung; oder Doppelamplitude: Differenz zwischen Maximum und Minimum.

Phase (Φ) augenblicklicher Zustand einer Schwingung innerhalb einer Periode, gegeben durch den Wert der Veränderlichen und ihrer sämtlichen zeitlichen Ableitungen; z.B. der Beginn der Laufaktivität um CT 12 Uhr.

Circadiane Zeit (CT) Die unter konstanten Umweltbedingungen freilaufende circadiane Periodenlänge τ = 24 Stunden CT; CT 0-12 ist der subjektive Tag; CT 12-24 ist die subjektive Nacht des Tieres. Bei nachtaktiven Tieren ist der Beginn der Laufaktivität um CT 12.

Zeitgeberzeit (ZT) Die Tageslänge eines externen Zeitgebers, wie z.B. des Licht-Dunkelwechsels, hat eine Periodenlänge von T = 24 Stunden ZT.

Synchronisation Zustand 2er oder mehrere Schwingungen, die auf Grund wechselseitiger oder einseitiger Beeinflussung gleiche Frequenz haben.

Mitnahme Koppelung einer selbsterregten Schwingung an einen Zeitgeber mit dem Ergebnis, dass beide Schwingungen gleiche Frequenz haben,

also synchronisiert sind; oder, dass ihre Frequenzen in einem ganzzahligen Verhältnis zueinander stehen (Frequenz-Demultiplikation), innerhalb begrenzter Frequenz-Bereiche.

Endogen Ein endogener Rhythmus ist stabil, konstant und ungedämpft, auch ohne äußere Zeitgeber.

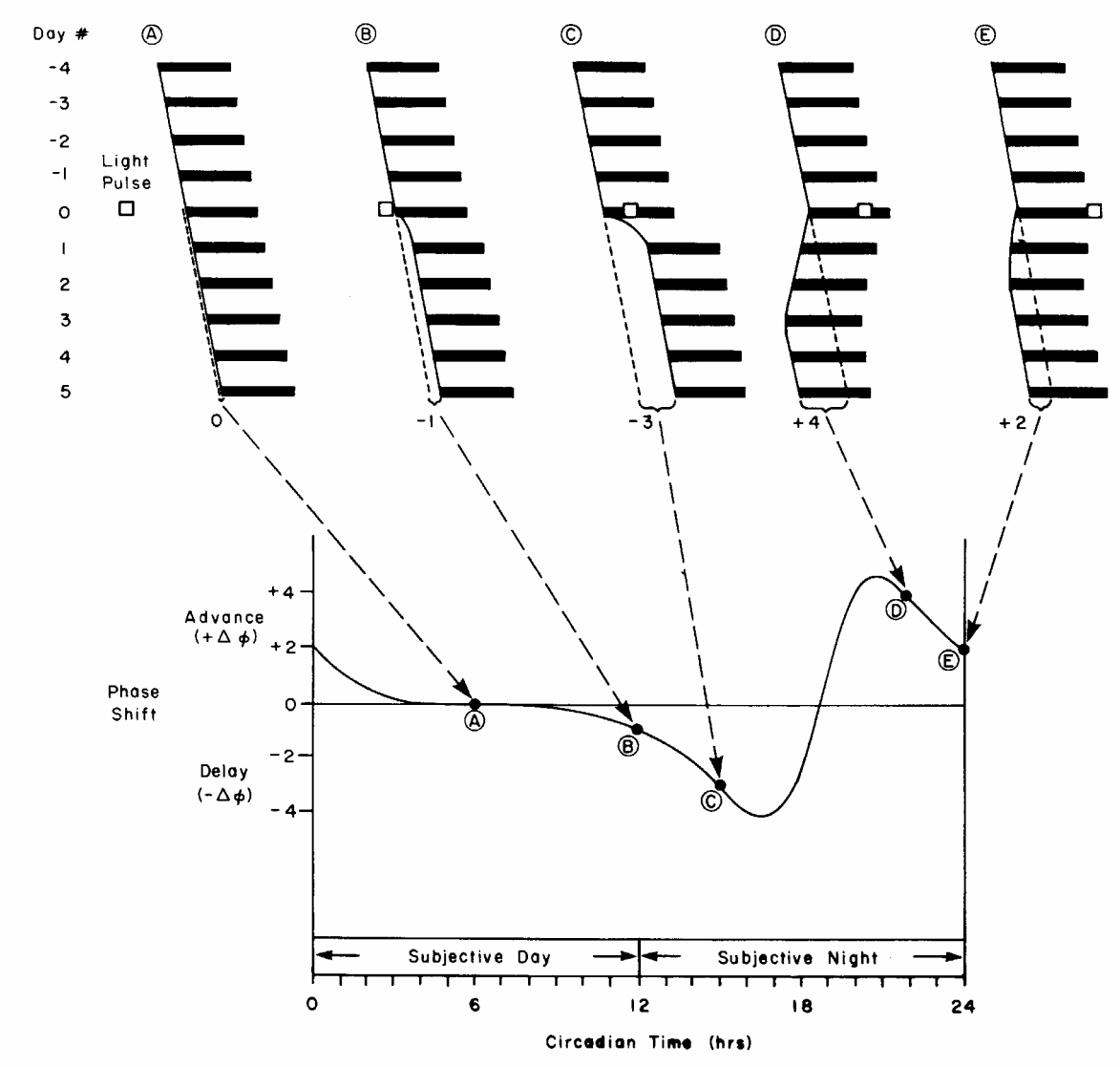
Freilaufend Ein freilaufender Rhythmus ist eine selbsterregte Schwingung unter konstanten Umweltbedingungen.

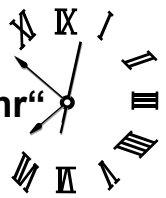
LD periodischer Licht-Dunkel-Wechsel.

L Lichtzeit, Dauer des Tages bei einer definierten Beleuchtungsstärke.

D Dunkelzeit, Dauer der Nacht bei einer definierten Beleuchtungsstärke.

Phasenantwort-Kurve (PRC) Beschreibt Ausmaß und Vorzeichen (+ = beschleunigt; - = verlangsamt) einer durch Einzelreize verursachte Phasen-Verschiebung in ihrer Abhängigkeit von der durch den Reiz getroffenen Phase.





Melatonin - ein Zeiger der „Inneren Uhr“

bei Säugern

Der vom circadianen Schrittmacherzentrum erzeugte Rhythmus wird über unterschiedliche Systeme an den Körper weiter vermittelt. Ein wichtiger, gut untersuchter Mechanismus ist die Umsetzung der circadianen Information der „Inneren Uhr“ in ein Melatonin-Hormonsignal bei Säugern.

- Hauptbildungsort des Hormons ist das Pinealorgan (Zirbeldrüse).
- Bei allen untersuchten Säugetieren lag das Maximum der Melatoninbildung immer in der (subjektiven) Nacht. Die Melatoninsynthese ist somit stark vom Beleuchtungsrhythmus abhängig. Man spricht in diesem Zusammenhang beim Melatonin auch vom „Hormon der Dunkelheit“.
- Da unter natürlichen Bedingungen die Länge der Dunkel- zur Hellphase von der Jahreszeit abhängt, verändert sich auch das Muster der Melatoninausschüttung. Das Hormon ist somit auch an der Vermittlung jahreszeitlicher (circannualer) Rhythmen beteiligt.
- Melatoninrezeptoren befinden sich u.a. in der pars tuberalis der Hirnanhangdrüse (Hypophyse).

Einige Wirkungen des Melatonins:

Melatonin
- erhöht die Schlafeffiziens, d.h. es hat schlaffördernde Eigenschaften.
- wirkt sich u.a. hemmend auf die Sekretion der Hormone FSH, LH und Prolaktin aus.
- steuert die jahreszeitliche Fortpflanzung.

2.1. Literatur zur Vorbereitung

Dudel, Menzel Schmidt "Neurowissenschaften" Springer Verlag, Kap.24

Penzlin, Kap. Biorhythmen 2005.

3. Versuche

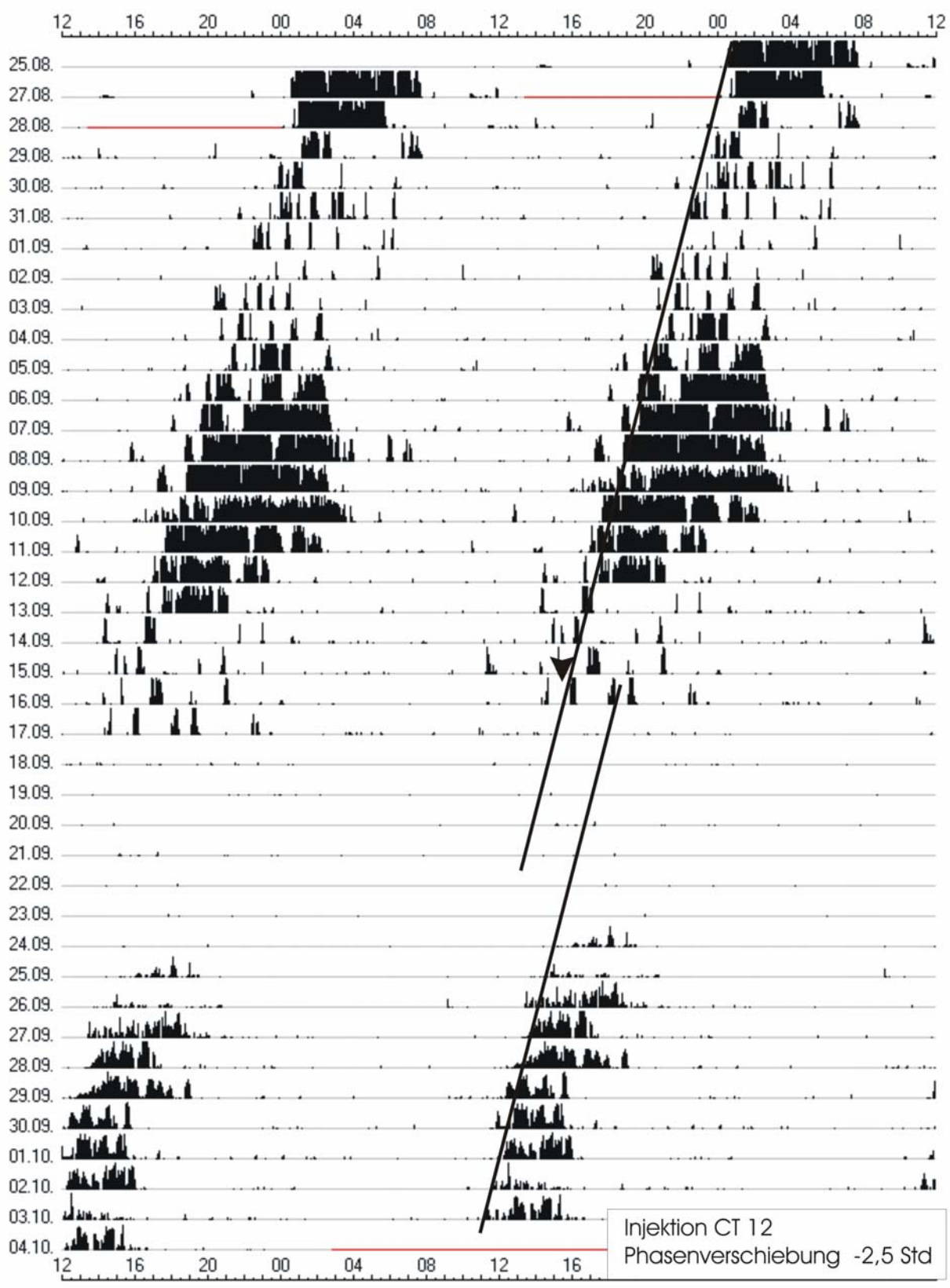
Ziel des Kurses ist, sich die **Grundbegriffe** der circadianen Rhythmik am Beispiel eines geeigneten Tiermodells zu **veranschaulichen und einzuprägen**. Im Kurs wird gelernt, **wie circadiane Parameter** in einem Verhaltenstest **gemessen werden** und wie ein chronobiologisches Experiment geplant, durchgeführt und ausgewertet wird. Diese **allgemeinen Grundprinzipien** sollen dann auf ein Experiment (ein Gedankenexperiment) mit Menschen, relevant **für die Chronomedizin, übertragen** werden.

Fragen:

1. Wie untersucht man, ob ein Aktivitäts-Rhythmus endogen oder exogen gesteuert wird?
2. Wie baut man einen solchen Versuch auf?
3. Wie analysiert man die Daten?
4. Wie testet man, ob Licht diesen Rhythmus beeinflußt?
5. Wie findet man heraus, ob eine bestimmte Krankheit circadian beeinflußt wird und weshalb ist es wichtig das zu wissen?

Aufgaben:

1. Bestimmen Sie die Periodenlänge der Laufaktivität einer Schabe (*Leucophaea maderae*) in L/D, in DD, in LL.
2. Setzen Sie die Tiere selbst in die Versuchsapparatur und benutzen Sie die vorhandene Software für die Datenaufnahme und -analyse.
3. Wie würden Sie testen, ob Lichtpulse den Rhythmus beeinflussen?
4. Skizzieren Sie schriftlich ein Chronomedizin-Experiment am Menschen.



Laufradaktvität einer Schabe im Dauerdunkel. Am 17.9. wurde ein Peptid in die Nähe des circadianen Schrittmacherzentrums injiziert, was zu einer Phasenverzögerung von 2.5 h führte. Zwei Tageslängen sind nebeneinander aufgetragen.